



Effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les stades précoces de poissons modèles : développement de bioessais et étude comparée de mélanges

Florane Le Bihanic

► To cite this version:

Florane Le Bihanic. Effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les stades précoces de poissons modèles : développement de bioessais et étude comparée de mélanges. Sciences agricoles. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR15254 . tel-01068302

HAL Id: tel-01068302

<https://theses.hal.science/tel-01068302>

Submitted on 24 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

Par Florane LE BIHANIC

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les stades précoces de poissons modèles

Développement de bioessais et étude comparée de mélanges

Directeur de recherche : Jérôme Cachot

Co-directeur : Xavier Cousin

Soutenue le 2 décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Mme GARRIC, Jeanne
M. AMARA, Rachid
M. LE FLOCH Stéphane
M. MASSABUAU Jean-Charles
M. COUSIN, Xavier
M. CACHOT, Jérôme

Directrice de recherche, IRSTEA
Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale
Dr Cedre
Directeur de recherche, CNRS
Chargé de recherche, INRA
Professeur, Université de Bordeaux 1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse

Résumé

La majorité des polluants organiques persistants, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont hydrophobes et de ce fait s'accumulent au cours du temps dans les sédiments aquatiques. Dans ce contexte, des tests ont été mis en œuvre sur embryons et pro-larves de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et de médaka japonais *Oryzias latipes* pour étudier la toxicité de ces contaminants. Un sédiment artificiel et de nouveaux critères d'effets sur l'intégrité de l'ADN et l'activité natatoire ont été développés pour améliorer la reproductibilité et la sensibilité des tests. Ces bioessais ont été appliqués à la comparaison de la toxicité de trois mélanges de HAP : un extrait pyrolytique et deux extraits issus d'un pétrole léger *Arabian Light* et lourd de type *Erika*. Les trois mélanges de HAP ont été enrobés sur un sédiment artificiel ou sur des graviers à des concentrations comparables à celles retrouvées dans l'environnement. L'exposition des embryons à ces matrices contaminées a provoqué des perturbations de l'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial, le métabolisme de la vitamine A, la formation de dommages à l'ADN ainsi que la synthèse d'hormones. Parallèlement ces mélanges ont induit des effets tératogènes, des perturbations de l'activité natatoire et des effets génotoxiques. Le degré de toxicité et le spectre d'effets induits étaient différents selon la composition des mélanges testés. Les mélanges pétrogéniques présentant une forte proportion en HAP de faibles poids moléculaires et HAP alkylés, se sont avérés plus toxiques envers les jeunes stades de développement de poissons que le mélange pyrolytique, composé en majorité de HAP à hauts poids moléculaires non substitués. Des résultats comparables ont été obtenus avec les modèles médaka japonais et truite arc-en-ciel.

Mots-clés : sédiment artificiel, mélange de HAP, médaka japonais, truite arc-en-ciel, tératogénicité, génotoxicité, test de locomotion, expression de gènes

Abstract

Most persistent organic pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are hydrophobic and therefore accumulate over time in aquatic sediments. In this context, tests were performed on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Japanese medaka *Oryzias latipes* embryos and prolarvae to study the toxicity of these contaminants. Artificial sediment and new integrative endpoints including DNA integrity and swimming activity were developed to improve reproducibility and sensitivity of the tests. These bioassays were applied to the toxicity assessment of three PAH mixtures: a pyrolytic extract and two petrogenic extracts from *Arabian Light* and *Erika* oils. The three PAH mixtures were spiked onto sediment or gravel at environmental relevant concentrations. Embryonic exposure to these contaminated matrices induced alteration of gene expressions involved in mitochondrial functions, vitamin A metabolism, DNA damages and hormone synthesis. In parallel, these mixtures induced teratogenicity, alteration of swimming activity and genotoxicity. The toxicity potency and spectrum of effects differed according to PAH mixture composition. The petrogenic mixtures, with high proportions of low molecular weight PAHs and alkylated PAHs, were more toxic to fish early life stages than the pyrolytic mixture, mainly composed of high molecular weight PAHs non substituted. Comparable results were obtained with Japanese medaka and rainbow trout early life stages.

Keywords: artificial sediment, PAH mixture, Japanese medaka, rainbow trout, teratogenicity, genotoxicity, locomotion assay, gene expression

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire EPOC de l'université Bordeaux 1 dans les équipes LPTC et EA. Il a été financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) dans le cadre du programme « Contaminant, Ecosystème et santé » à travers le projet de recherche ConPhyPoP (2009-002). Ce projet de thèse était inclus dans le LABEX COTE cluster of excellence « Evolution, adaptation et gouvernance des écosystèmes continentaux et côtiers ».

Je tenais à remercier sincèrement l'ensemble des personnes qui ont permis la réalisation de ces travaux de près ou de loin.

Je souhaiterai tout d'abord remercier les membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail : Mme Jeanne Garric directrice de recherche à l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) et Mr Rachid Amara professeur à l'Université du Littoral Côte d'Opale pour avoir accepté d'être rapporteurs. Merci pour leurs commentaires constructifs sur ce manuscrit et la soutenance de ces travaux. Je souhaite également remercier Stéphane Le Floch du CEDRE et Jean-Charles Massabuau directeur de recherche au CNRS pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres de mon comité de thèse pour leurs commentaires et conseils scientifiques dont j'ai pu bénéficier au cours de ce projet: Paco Bustamante de l'Université de La Rochelle, Patrice Gonzalez du laboratoire EPOC et Thierry Burgeot de l'Ifremer de Nantes.

Un grand merci particulier à Jérôme pour m'avoir encadré pendant ces trois ans de thèse. Tout a commencé en licence quand tu m'as donné le gout pour l'écotoxicologie, puis le master et enfin la thèse. Merci pour ton écoute, ta disponibilité et ta patience. Cette aventure à tes côtés était un réel plaisir. J'espère que le futur nous permettra de continuer à travailler ensemble. Mes sincères remerciements à Xavier Cousin également pour m'avoir co-encadré depuis la Rochelle. Merci pour tous tes encouragements et les nombreuses corrections d'articles.

Un chaleureux merci à toute l'équipe de tox Christelle, Bénédicte, Blandine, Anaïk, Laure et Jean-François pour leurs précieux conseils scientifiques, mais aussi pour leurs conseils culinaires, de lecture, ou encore sur la dernière sortie culturelle à ne pas manquer... A défaut de ne pas toujours avoir eu des résultats de manips satisfaisants, j'ai pu compter sur vous pour rendre mes journées au labo vraiment agréables.

J'aimerai également remercier deux entreprises qui m'ont gracieusement aidé: la gravière Sibelco de Mios pour m'avoir fourni graviers et sable indispensable à la réalisation de ce projet et la pisciculture Bellet de Ruelle sur Touvre pour m'avoir approvisionnée en alevins de truite afin que je puisse mettre au point les protocoles expérimentaux hors période de pontes. Merci à Laurent Labbé de l'INRA-PEIMA pour ses précieux conseils sur la fécondation in vitro des truites arc-en-ciel. Merci également à Agnès Feurtet-Mazel de la station marine d'Arcachon pour nous avoir prêté des canaux d'expérimentations à biofilms transformés temporairement en canaux d'éclosions pour les alevins de truite.

Merci à toutes les personnes qui m'ont formée pendant ces trois ans de thèse. En particulier merci à Hélène et Karyn pour les dosages des HAP ainsi que Patrice et Cerise pour les dosages en biologie moléculaire.

Merci à tous les doctorants que j'ai pu croiser : ceux du B2 avec ma précieuse Perrine, Huong super-master-writer, Iris la passionnée, Nicolas et Badreddine ; mais également ceux du A12 Yann, Hugues, Matthieu, Justine, Laura, Vincent, Coralie, sans oublier Prescilla et Caroline de La Rochelle. Merci Prescilla de m'avoir accompagnée dans la folle aventure du sédiment artificiel je me suis sentie moins seule devant nos résultats au début peu concluant...

Merci à tous les stagiaires qui sont passés au labo pendant ces trois ans de thèse. En particulier merci à Charline, Axelle, Philippine et Justine pour leur gaieté et leur amitié. Merci également à Vivien pour son aide sur ce travail.

Bien sûr, merci à mes amis Camille, Floriane, Robin, Samir, Pierre, Aurélie, Sandra, Margaux, Pauline et Sensei pour leur nombreux encouragements.

Un immense merci à ma merveilleuse famille pour son aide, son soutien et son écoute si précieuse.

Et un dernier tout particulier merci à mon fiancé Théo pour m'avoir toujours encouragé à m'épanouir dans mes choix.

Merci à tous.

Liste des abréviations et sigles

3R	réduction, raffinement et remplacement (<i>Reduce, Refine, and Replace</i>)
3RSDE	action nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans l'Eau par les installations classées
ADN	acide désoxyribonucléique
AhR	récepteur aryl hydrocarbure (<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>)
ARN	Acide Ribonucléique
ARNT	translocateur nucléaire du récepteur de l'aryl hydrocarbure (<i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>).
BaA	benzo[<i>a</i>]anthracène
BaP	benzo[<i>a</i>]pyrène
BER	réparation par excision de base (<i>Base excision repair</i>)
BSD	syndrome du sac bleu (<i>Blue Sac Disease</i>)
CoxI	cytochrome C oxydase sous-unité 1
CYP	cytochrome p450
DCE	Directive européenne Cadre sur l'Eau
DMBA	7,12-diméthylbenzo[<i>a</i>]anthracène
EC	conseil européen (<i>European Council</i>)
ECHA	agence européenne des produits chimiques (<i>European Chemical Agency</i>)
EDA	analyse dirigée par les bioessais (<i>Effect Directed Analysis</i>)
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EROD	éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase
ERS	milieu de développement des médakas (<i>Egg Rearing Solution</i>)
FET	Facteur d'Equivalent Toxique
Fluo	fluoranthène
GST	Glutathion-S-Transférase
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
IARC	centre international de recherche sur le cancer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INERIS	Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

IPCS	programme international sur la sécurité des substances chimique (<i>International Programme on Chemical Safety</i>)
ISO	organisation internationale de normalisation (<i>International Organization for Standardization</i>)
ITOPF	fédération internationale de lutte antipollution des armateurs de pétroliers (<i>International Tanker Owners Pollution Federation</i>)
Jpf	jour post fécondation
Koc	coefficient de partage carbone organique-eau
Kow	coefficient de partage octanol-eau (<i>octanol-water</i>)
LMPA	agarose à faible point de fusion (<i>Low Melting Point Agarose</i>)
LOEC	concentration minimale à laquelle un effet est observé (<i>Lowest Observed Effect Concentration</i>)
M	masse molaire
MELAc	test embryo larvaire médaka avec exposition par sédiment contact <i>Medaka Embryo Larval Assay with sediment Contact exposure</i>
MN	micronoyau
NER	réparation par excision de nucléotide (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NMPA	agarose à point de fusion normal (<i>Normal Melting Point Agarose</i>)
NOEC	concentration la plus élevée ne provoquant pas d'effet (<i>No Observed Effect Concentration</i>)
NQE	Norme de Qualité Environnementale
NRC	conseil national de recherches des Etats-Unis (<i>National Research Council</i>)
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
p.s.	poids sec
p/p	poids/poids
PCB	polychlorobiphényle
PEC	concentration prévisible du composé dans l'environnement (<i>Predicted Environmental Concentration</i>)
PMR	réponse photo-motrice (<i>Photo Motor Response</i>)
PNEC	plus forte concentration n'induisant pas d'effet (<i>Predicted No Effect Concentration</i>)
qPCR	réaction en chaine quantitative par polymérase (<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
QR	Quotient de Risque

RE	Récepteur des Estrogènes
REACH	enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques (<i>Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals</i>)
RNO	Réseau National d'Observation
ROCCH	Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral
Rpm	rotation par minute
SDP	Substance Dangereuse Prioritaire (classée par la DCE)
Sod(Cu)	superoxyde dismutase Cu/Zn
Sod(Mn)	superoxyde dismutase mitochondriale
SP	Substance Prioritaire (classée par la DCE)
SPD	Stade Précoce de Développement
ST	sulfotransférase
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TEQ	équivalent toxique (<i>Toxic Equivalent Quantity</i>)
UDPGT	UDP glucuronyltransférase
US EPA	agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
v/v	volume/volume

SOMMAIRE

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Remerciements.....	3
Liste des abréviations et sigles.....	5
Liste des figures	12
Liste des tableaux.....	14

Introduction Générale	16
------------------------------------	-----------

Chapitre I: Contexte de l'étude

1	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP.....	21
1.1	Caractéristiques physico-chimiques des HAP	21
1.2	Sources de HAP	23
1.2.1	HAP pyrolytiques.....	23
1.2.2	HAP pétrogéniques	23
1.2.3	HAP diagénétiques.....	23
1.3	Présence et devenir des HAP dans les milieux aquatiques	23
1.3.1	Présence des HAP pyrolytiques : exemple de l'estuaire de la Seine	24
1.3.2	Présence des HAP pétrogéniques.....	25
1.3.3	Compartiment sédimentaire	26
1.4	Réglementation des HAP	29
1.4.1	Directive Cadre sur l'Eau.....	29
1.4.2	Réglementation REACh.....	31
1.5	Méthodes d'évaluation de la toxicité des HAP	32
1.5.1	Facteurs d'équivalent toxique	32
1.5.2	Calcul de risques environnementaux.....	33
1.5.3	Evaluation de la toxicité de mélange d'hydrocarbures	34
2	Sensibilité des stades précoces de développement de poissons aux HAP.....	36
2.1	Définition des jeunes stades de développement.....	36
2.1.1	Réglementation des tests embryo-larvaires poissons	36
2.1.2	Domaine d'application des tests embryo-larvaires	39
2.2	Contamination et métabolisation des HAP	40
2.2.1	Biodisponibilité des HAP.....	40
2.2.2	Voies de contaminations des HAP	40
2.2.3	Bioaccumulation des HAP	43

2.2.4	Métabolisation et élimination des HAP	44
2.3	Effets des HAP.....	46
2.3.1	Activation du récepteur Ah	46
2.3.2	Mécanismes indépendant de l'activation du récepteur Ah.....	48
2.3.3	Tératogénicité.....	49
2.3.4	Génotoxicité et cancérogénicité	51
2.3.5	Effets immunotoxiques	53
2.3.6	Perturbation endocrinienne	54
2.3.7	Effets neurotoxiques.....	55
3	Modèles d'études.....	56
3.1	La truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i>	56
3.1.1	Présentation du modèle	56
3.1.2	Stades précoces de développement	57
3.1.3	Intérêts écotoxicologiques du modèle.....	58
3.2	Le médaka japonais <i>Oryzias latipes</i>	58
3.2.1	Présentation du modèle	58
3.2.2	Stades précoces de développement	60
3.2.3	Intérêts écotoxicologiques du modèle.....	61
4	Démarche scientifique	62

Chapitre II: Développement de bioessais pour l'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes

1	Présentation des tests embryo-larvaires poissons.....	67
1.1	Le test embryo-larvaire truite.....	67
1.1.1	Fécondation <i>in vitro</i>	67
1.1.2	Exposition embryonnaire	67
1.2	Le test embryo-larvaire médaka MELAc	68
1.2.1	Sédiment artificiel	68
1.3	Analyses chimiques et enrobage.....	69
1.3.1	Extraction de la fraction aromatique	69
1.3.2	Enrobage.....	69
1.3.3	Analyse chimique des HAP.....	69
1.4	Critères de toxicité	71
1.4.1	Effets létaux et développement	71
1.4.2	Rythme cardiaque.....	71
1.4.3	Biométrie.....	71
1.4.4	Malformations	72
1.4.5	Test de locomotion.....	75

1.4.6	Marqueurs d'intégrité génétique	76
1.4.7	Marqueurs d'expression génique	77
1.5	Analyses statistiques	80
2	Mise au point des tests embryo-larvaires	82
2.1	Mise au point du test embryo-larvaire truite.....	82
2.2	Mise au point du test embryo-larvaire médaka MELAc.....	87
2.2.1	Limite du sédiment naturel de référence	87
2.2.2	Sélection de la matière organique adéquate pour le MELAc.....	93
2.2.3	Article n°1 : Mise au point d'un sédiment artificiel de référence adéquat au MELAc 95	
2.2.4	Article n°2: Comparaison de sensibilité des tests embryo-larvaires médaka et poisson zèbre.....	113
2.2.5	Article n°3 : Mise au point de nouveaux marqueurs de toxicité sur embryons et larves de médaka.....	117

Chapitre III: Etude comparée de trois mélanges de HAP de types pyrolytique, pétrogénique léger et pétrogénique lourd

1	Présentation des trois mélanges de HAP	173
1.1	Le sédiment de l'estuaire de la Seine.....	173
1.2	Les pétroles <i>Arabian Light</i> et <i>Erika</i>	174
1.3	Les profils des trois extraits aromatiques.....	175
2	Article n° 4: Toxicité des trois mélanges de HAP sur les jeunes stades de truite arc-en-ciel 179	
3	Article n°5 & 6: Toxicité des trois mélanges de HAP sur les jeunes stades de médaka japonais 195	

Chapitre IV: Discussion générale & Conclusion

1	Synthèse des résultats et discussion.....	237
1.1	Optimisation du test MELAc	237
1.2	Toxicité comparée des trois mélanges de HAP	239
2	Pertinence du travail et perspectives	242
2.1	Sensibilité des marqueurs	242
2.1.1	Tests de génotoxicité comète et micronoyaux	243
2.1.2	Test de locomotion	243
2.1.3	Biométrie et malformations.....	243
2.1.4	Activités physiologiques	244
2.2	Intérêts et limites des bioessais	245
2.2.1	Evaluation de la toxicité et écotoxicité de contaminants	245
2.2.2	Comparaison inter-modèles expérimentaux.....	245
2.2.3	Perspectives concernant les bioessais	246

2.3	Evaluation de la toxicité de mélange de HAP	247
Références	250
 Annexes		
	ANNEXE 1 : Liste des publications, présentations orales, affichées, et vulgarisées	267
	ANNEXE 2 : A simple and reliable <i>in vivo</i> EROD activity measurement in single <i>Fundulus heteroclitus</i> embryo and larva	269

Liste des figures

Figure 1. Distribution globale des émissions de HAP en 2007. Pour chaque région, les sources sont illustrées par des graphiques (Shen et al. 2013). Le bleu illustre la proportion de HAP issus de la combustion fossile, le rose de la déforestation et des feux de forêts, le jaune du transport, le vert de l'agriculture, et le blanc de l'industrie.	24
Figure 2. Carte des principaux déversements de pétrole accidentels en Europe depuis 1967.	26
Figure 3. Protection des différents stades de développement de poissons par la législation européenne, croquis d'après (Iwamatsu 2004).	36
Figure 4. Transfert des HAP à travers les différents compartiments et contamination des embryons de poissons.	42
Figure 5. Bioaccumulation du fluoranthène chez les embryons et larves de médaka japonais. Abréviations : od – gouttelettes d'huile, y – vitellus sans les gouttelettes d'huile, gb – vésicule biliaire, i - intestin, ab – vessie natatoire. Les couleurs des images correspondent pour le rouge à un signal intense, pour le jaune à un signal modéré et le plus faible signal en bleu. (Hornung et al. 2004).	44
Figure 6. Synoptique du processus de biotransformation des HAP.	44
Figure 7. Hydroxylation de trois dérivés différents d'HAP alkylés. A – <i>para</i> hydroxylation du 1-méthyl-7-hydroxyphénanthrène. B- <i>para</i> hydroxylation du 1-méthyl-8-hydroxyphénanthrène.	45
Figure 8. Activation de l'Ahr par les HAP. XAP-2 et hsp90 représentent les molécules chaperonnes, et DRE le motif de reconnaissance. (Zhang 2011).	47
Figure 9. Toxicité de certains HAP suivant le log Kow. (Incardona et al. 2005, Incardona et al. 2004, Incardona et al. 2006, Incardona et al. 2011)	50
Figure 10. Expression des gènes codant pour la synthèse de l'aromatase A et l'aromatase B au cours du développement embryo-larvaire de poisson zèbre. Actin correspond au gène de référence. RE correspond à l'abréviation pour les récepteurs des œstrogènes. D'après (Callard et al. 2001).	54
Figure 11. Truite arc-en-ciel adulte (AGFC 2011).	56
Figure 12. Aire de répartition de la truite arc-en-ciel naturelle (en rouge) et après son introduction (en vert) (Québec 2009).	56
Figure 13. Développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel (Warren-Photographic 2013).	57
Figure 14. Médaka japonais. A – Couple d'adulte. B – Femelle adulte.	59
Figure 15. Développement embryonnaire de médaka japonais à 25 °C. Le temps et le stade de développement sont indiqués respectivement en bas à gauche et à droite de l'image (Orrego et al. 2011)	60
Figure 16. Démarche scientifique du projet de thèse.	62
Figure 17. Mesures d'une larve de médaka japonais à l'éclosion.	72
Figure 18. Test embryo-larvaire sur truite arc-en-ciel. A - Développement des embryons sur graviers (270 °J) ; B – Larve témoin sans anomalie visible ; C - Lordose ; D – Malabsorption du sac vitellin ; E – Lordose, hémorragies ; F : Hémorragies.	73
Figure 19. Test embryo-larvaire sur médaka japonais. A - Larve à l'éclosion témoin ne portant aucun signe de malformation. B et C - Œdèmes péri-cardiaques, coloration bleue illustrant le syndrome du BSD. D - Malformation de la mâchoire inférieure. E - Déformation de la mâchoire : 3 globes oculaires. F – Cyclopie : 1 globe oculaire unique. G - Scoliose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan frontal. H - Lordose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan médian. I - Cyphose : hyper convexité du squelette ; et lordose. J - Hémorragie située sur la mâchoire inférieure. K - Hémorragie sur le contour de l'œil. L -	

Anémie : très faible coloration du sang. M - Position et taille des chambres cardiaques d'un individu témoin. N - Malformation de la taille d'un ventricule : Ventricule droit atrophié. O – Anomalie de la taille et de la position du ventricule.	74
Figure 20. Analyse de l'activité natatoire des larves de médaka japonais. A – Trajectoire des larves tracées dans chacun des puits d'une microplaque 48 puits par le logiciel Ethovision; B – Chambre d'analyse Daniovision, Noldus®.....	75
Figure 21. Tests de génotoxicité. A - Test des comètes : cellule de médaka japonais dont l'ADN endommagé a migré pour former une queue de comète. B – Test des micronoyaux : cellule de médaka japonais micronuclée.....	76
Figure 22. Migration des amplicons sur gel d'électrophorèse. A : marqueurs de taille, B : amplicon de <i>12s</i> , C : amplicon de <i>caspase 3</i> , D : amplicon de <i>β-catenin</i> , E : amplicon de <i>cyp19b</i> , F : amplicon de <i>gadd45</i>	80
Figure 23. A - Développement embryonnaire en condition <i>statique</i> et <i>semi-statique</i> . B - Développement embryonnaire en eau de source uniquement. C - Développement embryonnaire sur graviers. D et E - Développement embryonnaire en condition <i>dynamique</i> (canaux).	83
Figure 24. Mortalité embryonnaire après 3 jours d'exposition (de 190 à 220°J). L'abréviation Pt de N fait référence au site de prélèvement Pont de Normandie. (N = 3)	84
Figure 25. Survie embryonnaire à 180°J (%). (Anova, $p < 0,05$, N = 3, aucune différence significative).....	85
Figure 26. Variations de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de BaP ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment prélevé en 2008 ou 2010. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux témoins respectifs (N=3, $p < 0.05$).	88
Figure 27. Variations de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de DMBA ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment prélevé en 2008 ou 2010. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux témoins respectifs (N=3, $p < 0.05$).	89
Figure 28. Variation de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de DMBA ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment broyé ou tamisé. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs (N=3, $p < 0.05$).	90
Figure 29. Variation de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 25X de DMBA ($12.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment broyé ou tamisé. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs (N=3, $p < 0.05$).	91
Figure 30. Le DMBA provoque des anémies chez les individus exposés à la concentration 25X. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs (N=3, $p < 0.05$).	91
Figure 31. A - Embryon témoin 8 jours post fécondation. B - Embryon exposé au DMBA 5X (sédiment broyé) 8 jours post fécondation et montrant une absence de coloration des zones cardiaques et vitellines.	92
Figure 32. Estuaire de la Seine : Site de prélèvement Oissel. (Fluvialnet 2013 modifié) ..	173
Figure 33. Nombre de cycles constituant les trois extraits.	177
Figure 34. Profil de méthylation des trois extraits HAP Pyrolytique, de l' <i>Erika</i> , et l' <i>Arabian Light</i>	178
Figure 35. Implications des gènes <i>cypla</i> , <i>p53</i> , <i>sod(Cu)</i> , <i>coxI</i> , <i>12s</i> , <i>rara1</i> et <i>cyp19b</i> dans l'embryotoxicité des mélanges de HAP sur SPD de médaka japonais.	241

Liste des tableaux

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des HAP (ATSDR 1995, INERIS 2005, Ruelle 2000, Sverdrup et al. 2002, van Noort 2009).	22
Tableau 2. Apports des HAP dans l'estuaire de la Seine en 2002-2003 (Dégremont & Cachot 2009).	25
Tableau 3. Concentrations en HAP dans les sédiments de lacs, estuaires et côtes de plusieurs sites dans le monde (ng.g^{-1}).	28
Tableau 4. Liste des HAP inclus dans la liste des substances polluantes prioritaires (SP) et dangereuses prioritaires (SDP) de la DCE.	30
Tableau 5. Restriction de l'utilisation de 8 HAP par REACH dans les pneumatiques et huiles de dilution et matériaux dont l'utilisation peut conduire à un contact avec la peau de plus de 30s.	32
Tableau 6. Classement FETs des HAP en fonction de leur potentiel cancérigène et agoniste de l'Ahr.	33
Tableau 7. Valeurs de PNEC calculées pour 5 HAP modèles vis-à-vis de la contamination de l'estuaire de la Seine (Lachambre & Fisson 2007).	34
Tableau 8. Comparaison des trois tests normalisés incluant des stades précoces de développement de poissons.	38
Tableau 9. Génotoxicité et cancérogénicité des HAP d'après les classements de l'IPCS et de l'IARC.	53
Tableau 10. Classification de la truite arc-en-ciel (ITIS 2013).	57
Tableau 11. Classification du médaka japonais (ITIS 2013).	59
Tableau 12. Comparaison du développement embryo-larvaire du médaka japonais et de la truite arc-en-ciel en conditions contrôlées de laboratoire.	61
Tableau 13. Composition de l'eau de source Saint-Martin (24610, St Martin de Gurçon).	67
Tableau 14. Dosage des composés HAP.	70
Tableau 15. Amorces PCR et numéros d'accès des gènes étudiés.	79
Tableau 16. Protocole expérimental de l'expérience B.	83
Tableau 17. Effet du renouvellement de l'eau et du substrat d'incubation sur le développement embryo-larvaire des truites arc-en-ciel. Les flèches représentent une valeur significativement plus élevée (\uparrow) que les individus témoins développés en condition dynamique.	85
Tableau 18. Concentrations en HAP dans les sédiments enrobés en BaP et DMBA sur les sédiments d'Yville 2008 et 2010.	88
Tableau 19. Concentrations en HAP dans les sédiments enrobés en DMBA sur le sédiment Yville broyé ou tamisé avant enrobage.	89
Tableau 20. Effets de la concentration d'acide humique dans les sédiments enrobés en Fluo sur le développement des médaka japonais. Les astérisques réfèrent à une différence significative avec le contrôle solvant respectif pour chaque concentration de tourbe (Moyenne \pm ET, N = 3, Test Student, $p < 0.05$).	94
Tableau 21. Composition chimique du sédiment d'Oissel, juin 2003 (Cachot et al. 2006).	174
Tableau 22. Composition chimique du pétrole <i>Arabian Light</i> et <i>Erika</i> .	174
Tableau 23. Profils chimiques des extraits pyrolytique, issu de pétrole <i>Arabian Light</i> et de pétrole <i>Erika</i> (ng/g^{-1}).	176
Tableau 24. LOEC (somme des HAP $\mu\text{g.g}^{-1}$) des fractions aromatiques pyrolytique, <i>Arabian Light</i> et <i>Erika</i> .	240
Tableau 25. Sensibilité des différents marqueurs du test MELAc. Les embryons de médaka ont été exposés au contact du sédiment artificiellement enrichi en HAP pendant tout le temps	

de leur développement. Les marqueurs ayant répondu à la plus faible concentration testée sont indiqués par le symbole X..... 242

Tableau 26. Calcul des TEQ des 3 mélanges vis-à-vis du BaP et du TCDD. Seulement les 16 HAP de l'US EPA ont été pris en considération. Le dibenzo[*ah*]anthracène co-élue avec le dibenzo[*ac*]anthracène et le chrysène avec le triphénylène, leur concentrations ont donc été prise en compte dans le calcul..... 247

Introduction Générale

Les activités humaines et industrielles représentent une réelle source de pollution pour l'environnement. Leur intensification au cours des dernières décennies a entraîné une contamination exponentielle de l'environnement. De nombreux contaminants ont ainsi été introduits dans les écosystèmes aquatiques: hydrocarbures, métaux, solvants, polychlorobiphényles, pesticides, micropolluants etc. Ainsi la mise en place de dispositifs de surveillance est devenue nécessaire.

Depuis 1972, la commission OSPAR œuvre pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique Nord-est et de ses ressources. Cette commission regroupe 15 gouvernements européens qui identifient les menaces sur l'environnement aquatique et met en place des programmes d'actions (OSPAR 1992). Ce travail propose une approche éco-systémique dont l'objectif principal est la gestion intégrée des activités anthropiques dans l'environnement marin. Afin de mettre en place les actions de la commission OSPAR, le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), devenu le Réseau National d'Observation de la Contamination Chimique du littoral (ROCCH), évalue les concentrations de contaminants et leur évolution sur le territoire français depuis 1974 (Claisse et al. 1992). Ces dispositifs de surveillance mesurent un large spectre de contaminants dont les métaux lourds, les polychlorobiphényles (PCB), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les analyses sont réalisées sur trois matrices : dans la colonne d'eau, dans le sédiment et dans les coquillages. En effet, les contaminants sont omniprésents dans les différents compartiments du milieu aquatique. Ainsi, la surveillance chimique du bassin d'Arcachon (Gironde, France) entre 2008 et 2009, a révélé environ 10-20 ng.L⁻¹ de HAP dans les masses d'eau, 2000-10000 ng.g⁻¹ p.s. de HAP dans les sédiments, et 200-500 ng.g⁻¹ p.s. dans les tissus d'huîtres cultivées (Crespo 2009). La contamination des organismes aquatiques par les HAP peut se faire par la voie aqueuse, par contact avec les sédiments, par voie trophique ou par voie maternelle pour certains organismes.

Bien que les risques écotoxicologiques des HAP pour l'environnement soient étudiés depuis plusieurs dizaines d'années, l'évaluation de ces composés en mélange demeure problématique. Les approches de terrain et expérimentales ont permis de déterminer un grand nombre d'effets et de mécanismes d'action des HAP. Cependant ces approches souvent ne reflètent pas les conséquences d'une exposition à des mélanges complexes. Les études de terrain peuvent prendre en compte plusieurs facteurs interagissant avec la toxicité des composés, tandis que les expositions en laboratoire sont souvent peu représentatives de l'environnement avec des composés purs ou des concentrations élevées.

Les tests embryo-larvaires poissons sont largement utilisés en toxicologie et écotoxicologie. Ils présentent deux avantages majeurs : une grande sensibilité aux contaminants ainsi que leur non prise en compte par la législation européenne sur l'expérimentation animale (EC 2010). De plus ils respectent le règlement européen REACH qui requière la réduction, le raffinement et le remplacement des animaux pour l'évaluation de la toxicité des contaminants (EC 2006). Les tests de toxicité normalisés sur embryons de poissons actuellement disponibles, tel que les tests ISO 12890, OCDE 210, 212, 236, proposent uniquement des expositions aux composés sous la forme dissoute. Dans les milieux aquatiques, les molécules hydrophobes comme les HAP, s'adsorbent sur les surfaces ou s'agrègent entre elles et s'accumulent dans les sédiments. L'exposition aux HAP par voie aqueuse est limitée par la solubilité du composé et peut conduire à une sous-estimation de leur toxicité. Pour pallier ce problème, des tests embryo-larvaires poissons avec exposition par sédiment contact ont récemment été développés pour les composés organiques (Hollert et al. 2003, Vicquelin et al. 2011). Cependant les tests proposés utilisent un sédiment naturel de référence dont la composition peut varier, ce qui rend leur utilisation aléatoire et difficile pour des tests de toxicité.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet de recherche « Contamination et Physiologie des Poissons exposés aux Polluants » **ConPhyPoP**. L'objectif de ce projet était d'étudier la contamination de poissons et les effets des HAP suite à des expositions représentatives des conditions environnementales en termes de scénario d'exposition, de mélanges de HAP étudiés et de concentrations testées. L'étude s'est concentrée plus particulièrement sur trois mélanges: un mélange pyrolytique, et deux mélanges pétrogéniques issus d'un pétrole lourd et d'un pétrole léger. Au cours de ce projet, la biodisponibilité, la bioaccumulation et les effets de ces composés sur les poissons ont été analysés et comparés. Quatre tâches principales ont été définies :

- Etudier la cinétique de contamination des poissons exposés à des mélanges de HAP pertinents en termes de respect de doses, de voie de contamination et de stades de développement,
- Déterminer les concentrations en HAP parents et métabolites dans les poissons,
- Obtenir un aperçu des effets d'une telle exposition sur les grandes fonctions physiologiques et du développement à savoir la croissance, l'immunité, la digestion, l'osmorégulation, le comportement, le métabolisme et la reproduction des poissons,
- Identifier les indicateurs précoces d'effets tardifs et développer des tests embryo-larvaires adaptés à l'évaluation des composés hydrophobes.

Ainsi, différents stades de développement de poissons ont été exposés à ces mélanges. Deux modes d'exposition ont été sélectionnés : la voie trophique et la voie sédimentaire. Les modifications physiologiques ont été étudiées tout au long du cycle de vie du poisson : stade embryo-larvaire, juvénile et adulte. D'une part l'étude d'effets à long terme via une contamination trophique chronique a été réalisée sur le poisson modèle poisson zèbre *Danio rerio*. D'autre part des tests embryo-larvaires adaptés aux composés hydrophobes ont été développés sur les modèles poisson zèbre, truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et médaka japonais *Oryzias latipes*. ConPhyPoP a été financé par l'agence nationale pour la recherche, programme « contaminants, écosystèmes et santé ».

Dans le cadre du projet ConPhyPoP, ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier les effets des HAP sur les stades précoces de développement de poissons. Ce travail visait à développer des tests permettant l'évaluation de la toxicité des composés hydrophobes purs et en mélange, ainsi que des sédiments contaminés. Cette étude était axée plus spécifiquement sur trois points :

- **Développer un test embryo-larvaire sur deux espèces de poisson** médaka japonais et truite arc-en-ciel. Mettre au point un plan d'expérience réaliste, proche des conditions environnementales. Valider le protocole avec des composés modèles hydrophobes.
- **Développer de nouveaux marqueurs de toxicité** spécifiques de diverses réponses de l'organisme sur embryons et larves de façon à augmenter le spectre d'effets détectés et la sensibilité des tests.
- **Etudier la biodisponibilité et la toxicité de mélange de HAP** de sources différentes représentant des situations réalistes et contrastées en utilisant deux espèces de poissons modèles.

Dans un premier temps le **chapitre I** synthétise le contexte bibliographique de l'étude en présentant les composés HAP et la sensibilité des jeunes stades de poissons à ces composés.

Le développement des tests embryo-larvaires est proposé dans le **chapitre II** en décrivant les mises au point méthodologiques réalisées pour la truite puis le médaka japonais.

Le **chapitre III** est consacré à l'étude comparative de la toxicité des trois mélanges différents de HAP. La toxicité de ces trois mélanges est évaluée par les tests embryo-larvaires sur la truite comme sur le médaka.

Pour finir, le **chapitre IV** résume l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude, puis discute la pertinence de ces travaux.

CHAPITRE I

Contexte de l'étude

Dans un premier temps, la famille de polluants des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sera présentée : propriétés physico-chimiques, sources, occurrence dans l'environnement aquatique, méthodes d'évaluation de leur toxicité et réglementation associées. Dans un deuxième temps, nous détaillerons la sensibilité des jeunes stades de développement de poissons envers ces contaminants. Les mécanismes de contamination et métabolisation ainsi que les effets toxiques des HAP y seront détaillés. Pour finir nous introduirons les deux modèles d'études choisis pour ce projet de recherche : la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et le médaka japonais *Oryzias latipes*.

1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP




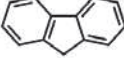
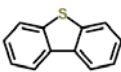
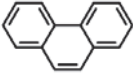
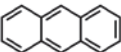
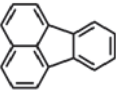
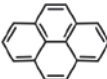
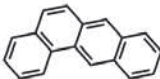
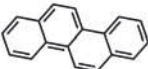
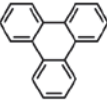
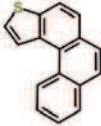

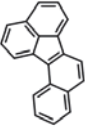
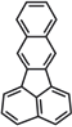

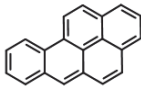
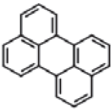
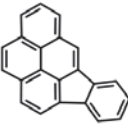
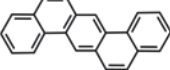
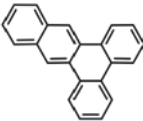
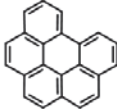
1.1 Caractéristiques physico-chimiques des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une grande famille de composés chimiques constitués d'atomes d'hydrogène et de carbone. Ils présentent au minimum 2 cycles benzéniques pouvant être substitués. Ces composés sont considérés semi-volatils, notamment les HAP de faible poids moléculaires. Les caractéristiques physico-chimiques sont liées au coefficient octanol-eau (K_{ow}), au coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) et à la masse molaire (M) rassemblés dans le tableau ci-dessous. Le coefficient K_{ow} indique l'hydrophobicité d'une substance, tandis que le coefficient K_{oc} indique sa préférence pour la matière organique. Plus ces coefficients de partage sont élevés, plus la molécule aura tendance à s'adsorber sur des matrices solides. L'aromaticité couplée à la conformation planaire des HAP assure à ces molécules une grande stabilité chimique. L'aromaticité des molécules entraîne une délocalisation des électrons π et ainsi une diminution de l'énergie de la molécule. Les HAP subissent trois types de réactions chimiques : la substitution électrophile indépendante des cycles benzéniques, les réactions d'oxydation et les réactions de réduction qui mettent en jeu les noyaux aromatiques, et de surcroît la stabilité chimique de la molécule (Hansen et al. 2003). On regroupe les HAP suivant leur poids moléculaire (ATSDR 1995):

- les HAP légers avec une masse molaire comprise entre 151 et 178 g.mol⁻¹ comme le naphthalène, l'acénaphthylène, l'acénaphène, le fluorène et le phénanthrène,
- les HAP mediums avec une masse molaire d'environ 202 g.mol⁻¹ comme par exemple le fluoranthène et le pyrène,
- et les HAP lourds avec une masse moléculaire au-delà de 228 g.mol⁻¹ comme par exemple le benzo[*a*]anthracène, les benzo[*a*]fluoranthènes, le benzo[*e*]pyrène, le benzo[*a*]pyrène et le benzo[*ghi*]pérylène.

Les HAP soufrés présentant un ou plusieurs atomes de soufre sont généralement inclus dans la classification des HAP. C'est le cas du dibenzothiophène et du benzo[*b*]naphto[1,2-*d*]thiophène.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des HAP (ATSDR 1995, INERIS 2005, Ruelle 2000, Sverdrup et al. 2002, van Noort 2009).

					
	Naphtalène*	Acénaphtylène*	Acénaphène*	Fluorène*	Dibenzothiophène
Log Kow	3,2-3,4	3,6-4,1	3,9-4,0	3,8-6,6	4,4 ^b
Log Koc	3,1	1,4-3,8	3,7-3,8	3,9-6,2	nd ¹
M (g.mol⁻¹)	128	152	154	166	184
					
	Phénanthrène*	Anthracène*	Fluoranthène*	Pyrène*	Benzo[a]anthracène*
Log Kow	4,5-4,6	4,5-4,6	4,9-5,2	4,9-5,2	5,6-5,9
Log Koc	4,2	4,2-4,4	4,6-4,7	4,6-4,8	5,3
M (g.mol⁻¹)	178	178	202	202	228
					
	Chrysène*	Triphénylène	Benzo[b]naphtho[1,2-d]thiophène	Benzo[b]fluoranthène*	
Log Kow	5,1-5,9	5,5-5,9	5,1	6,0-6,6	
Log Koc	5,3-5,4	nd	nd	5,7-5,9	
M (g.mol⁻¹)	228	228	234	252	
					
	Benzo[j]fluoranthène	Benzo[k]fluoranthène*	Benzo[e]pyrène	Benzo[a]pyrène*	
Log Kow	6,1	6,1-6,8	6,1	6,1-6,3	
Log Koc	4,7	5,7-5,9	nd	5,7-6,7	
M (g.mol⁻¹)	252	252	252	252	
					
	Pérylène	Dibenzo[ah]anthracène*	Dibenzo[ac]anthracène	Benzo[ghi]pérylène*	
		Indéno[1,2,3-cd]pyrène*			
Log Kow	6,3-6,4	6,6-7,6	6,5-7,3	7,2-7,3	6,5-6,6
Log Koc	5,9	6,1-6,2	6,0-6,5	nd	6,2
M (g.mol⁻¹)	252	276	278	278	276

¹pas de données disponibles

*HAP considérés prioritaires par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (USEPA 1990)

Certains HAP peuvent être substitués. Ils présentent alors des groupements alkylés d'un ou plusieurs atomes de carbone. Les chromatogrammes de ces composés apparaissent sous la

forme de plusieurs pics parfois co-éluant en massifs de pics. Il n'est alors pas possible de les distinguer. Les HAP alkylés fréquemment étudiés sont :

- les dérivés alkylés du naphthalène : 2-méthylnaphtalène, 1-méthylnaphtalène, diméthylnaphtalènes, triméthylnaphtalènes, tetraméthylnaphtalènes,
- les dérivés alkylés du phénanthrène et de l'anthracène : 3-méthylphénanthrène, 2-méthylphénanthrène, 2-méthylantracène, 9-méthylphénanthrène, +2-méthylantracène, 1-méthylphénanthrène, diméthylphénanthrènes, triméthylphénanthrènes,
- les alkylés dérivés du dibenzothiophène : 4-méthyldibenzothiophène, 3+2-méthyldibenzothiophène, 1-méthyldibenzothiophène,
- les alkylés dérivés du chrysène : les méthylchrysènes.

1.2 Sources de HAP

On distingue trois origines différentes de HAP: pyrolytique, pétrogénique, et diagénétique.

1.2.1 HAP pyrolytiques

Les HAP d'origine pyrolytique résultent d'une courte combustion incomplète à haute température (1500-2000 °C) de matière organique comme les pétroles et la biomasse fossile. Les HAP pyrolytiques sont en majorité d'origine anthropique et sont issus de l'industrie chimique, de la sidérurgie, des moteurs à combustion ou incinérateurs de déchets urbains et également des incendies (Hansen et al. 2003). Ces mélanges de HAP présentent une majorité de molécules de hauts poids moléculaires. Les HAP substitués sont généralement retrouvés en faibles quantités dans les mélanges d'origine pyrolytique.

1.2.2 HAP pétrogéniques

Le processus de diagénèse peut donner naissance à des pétroles et autres combustibles fossiles contenant des HAP dits pétrogéniques. Ces HAP sont formés à basse température (150 °C), sur des longues périodes de temps. Ils résultent d'une exposition de la matière organique à des conditions adéquates de température et de pression (Hansen et al. 2003). La proportion en HAP dans les pétroles varie selon leur origine et leur niveau de raffinements. D'une manière générale les mélanges de HAP pétrogéniques sont marqués par une prédominance en HAP de faible poids moléculaire, 3 cycles et moins, et en HAP substitués.

1.2.3 HAP diagénétiques

Bien que les HAP pyrolytiques et pétrogéniques représentent les catégories majeures de HAP dans l'environnement, des HAP diagénétiques, aussi appelés biogéniques, peuvent être formés par les organismes vivants. Cette source de HAP est naturelle. Par exemple certaines plantes conduisent à la formation de composés tels que le rétène, et autres dérivés du phénanthrène et le chrysène (Hansen et al. 2003).

1.3 Présence et devenir des HAP dans les milieux aquatiques

L'émission des HAP dans l'environnement est directement liée aux activités anthropiques comme l'illustre la figure ci-dessous. La quantité de HAP émise dans l'atmosphère a

augmenté de 43 000 tonnes à 520 000 tonnes entre 1987 et 2004 (Eisler 1987, Zhang & Tao 2009).

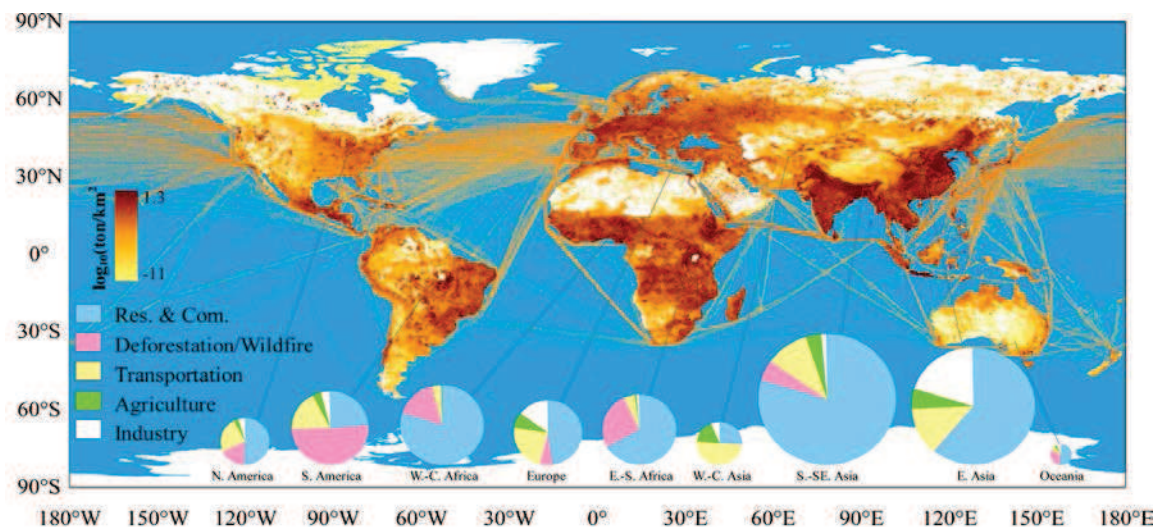


Figure 1. Distribution globale des émissions de HAP en 2007. Pour chaque région, les sources sont illustrées par des graphiques (Shen et al. 2013). Le bleu illustre la proportion de HAP issus de la combustion fossile, le rose de la déforestation et des feux de forêts, le jaune du transport, le vert de l'agriculture, et le blanc de l'industrie.

L'apport des HAP dans le compartiment aquatique est à la fois :

- **chronique** de par l'existence de nombreuses sources diffuses d'origine naturelle et anthropique, et ce pour les HAP pyrolytiques, pétrogéniques et diagénétiques,
- et **accidentel** avec des feux de forêt ou des éruptions volcaniques pour les HAP pyrolytiques, et des accidents de production et d'exploitation du pétrole (marée noire, rupture d'oléoducs...) pour les HAP pétrogéniques.

1.3.1 Présence des HAP pyrolytiques : exemple de l'estuaire de la Seine

Les HAP pyrolytiques sont les plus représentés dans les milieux aquatiques. Après l'émission des HAP pyrolytiques dans l'atmosphère, les molécules retombent et se déposent à la surface de l'eau ou du sol. Sous l'action du lessivage des sols les HAP sont transportés vers les masses d'eaux. Ces molécules hydrophobes s'associent alors avec d'autres particules de la colonne d'eau et s'accumulent dans le sédiment.

Prenons l'exemple de l'estuaire de la Seine, un site d'étude de référence pour sa contamination en HAP. D'après une étude réalisée entre 1995 et 2005 par le groupement d'intérêt public Seine Aval, les concentrations en acénaphthène, anthracène, naphtalène, fluoranthène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*ghi*]pérylène et indéno[123-*cd*]pyrène dans le sédiment de l'estuaire de la Seine fluctuent entre 1 et 10 000 µg/kg. Les plus fortes concentrations de HAP dans le sédiment ont été retrouvées à proximité des zones fortement anthropisées.

Les concentrations retrouvées dans l'environnement dépendent de plusieurs facteurs météorologiques et anthropiques. Le bassin versant de la Seine apporte la majorité des HAP retrouvés dans l'estuaire (**Tableau 2**). L'origine de cet apport est diverse : retombées atmosphériques en amont, ruissellement, apports du sol etc. Viennent ensuite les retombées atmosphériques directes responsables pour près de 30 % des HAP. Les apports atmosphériques indirects de HAP ont été estimés à 573 kg.an⁻¹, et les apports atmosphériques directs de 2.5 à 16 kg.an⁻¹. Chaque année environ 137 kg de HAP seraient stockés dans les sols du bassin versant (Motelay-Massei et al. 2003).

Tableau 2. Apports des HAP dans l'estuaire de la Seine en 2002-2003 (Dégremont & Cachot 2009).

Apports atmosphériques	29 %
Apports de l'amont de la rivière	43 %
Apports par ruissellement	21 %
Apports des stocks du sol	7 %

1.3.2 Présence des HAP pétrogéniques

Les activités maritimes et portuaires sont à l'origine des déversements réguliers de HAP pétrogéniques dans les milieux aquatiques. Des accidents liés aux activités d'exploitation et de transport de pétrole peuvent également répandre ponctuellement de grande quantité de pétrole dans l'environnement. La fédération internationale de lutte antipollution des armateurs de pétroliers ITOPF (*International Tanker Owners Pollution Federation*) a répertorié 2 557 000 tonnes de pétrole déversées par accident dans les eaux internationales depuis 1967 dont 1 149 000 tonnes dans les eaux européennes (ITOPF 2013). La **Figure 2** répertorie les principaux accidents pétroliers pendant ces 50 dernières années. A titre d'exemple, 223 000 tonnes de pétrole ont été déversées sur les côtes bretonnes suite au naufrage de l'*Amoco Cadiz*, 144 000 tonnes ont été déversée au large de l'Italie suite au naufrage de l'*Haven*, et 20 000 tonnes suite au naufrage de l'*Erika*.

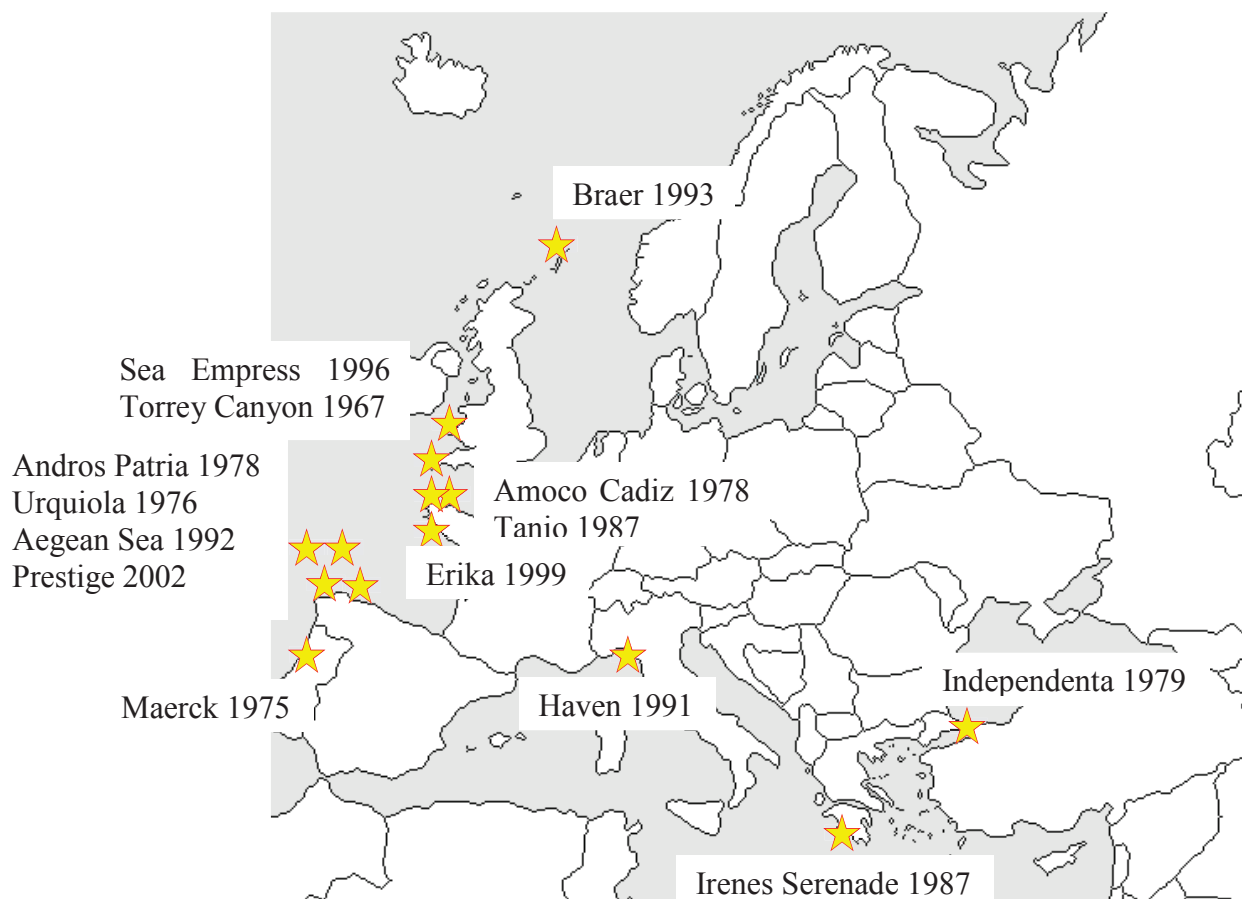


Figure 2. Carte des principaux déversements de pétrole accidentels en Europe depuis 1967.

Les processus naturels de suintement de pétrole depuis les couches sédimentaires profondes ne sont pas négligeables quant à l'apport des hydrocarbures dans l'environnement (Short et al. 2007). Le conseil national de la recherche des Etats-Unis (*National Research Council*) a rapporté qu'environ 45 % du pétrole retrouvé dans les eaux d'Amérique du nord provenait de suintements naturels (NRC 2003). Parmi eux, le site de Santa Barbara relâche jusqu'à 16 000 L de pétrole quotidiennement (Hornafius et al. 1999).

1.3.3 Compartiment sédimentaire

1.3.3.1 Persistance des HAP

En raison de leur forte capacité à adsorber et à stocker les contaminants, les sédiments sont un réservoir majeur pour les polluants organiques persistants tels que les HAP. Les sédiments représentent de ce fait une source de contamination secondaire pour les écosystèmes aquatiques (Harris et al. 1996). Les HAP s'accumulent sur les particules solides et sont retrouvés en grande quantité dans les lacs, les rivières, les estuaires et les eaux côtières. Ils sont piégés dans la structure complexe et flexible de la matière organique du sédiment, ce qui réduit leur potentiel de désorption (Depree 2008). L'affinité des HAP pour la matière organique varie suivant leur poids moléculaire. Les HAP de hauts poids moléculaire vont être préférentiellement adsorbés aux particules contrairement aux HAP légers, comme le naphthalène, présents en majorité dans la colonne d'eau (Cailleaud et al. 2007). Une fois fixés

aux particules en suspension, les HAP peuvent être transportés sur de longues distances et s'accumuler dans les sédiments.

Les sources de HAP sont nombreuses. Ces composés sont retrouvés en quantité importante sur toute la surface du globe, en particulier dans le compartiment sédimentaire comme illustré par le **Tableau 3**. La majorité des HAP retrouvés dans les sédiments aquatiques sont d'origine pyrolytique puis pétrogénique (Budzinski et al. 1997, Hansen et al. 2003). Les HAP diagénétiques quant à eux se retrouvent à un niveau plus faible dans le milieu aquatique.

Tableau 3. Concentrations en HAP dans les sédiments de lacs, estuaires et côtes de plusieurs sites dans le monde (ng.g⁻¹).

Ecosystèmes	Lac	Rivières					Zones côtières		
	Pacifique Nord-Ouest (USA) ^a	Rivière Lenga (Concepción, Chili) ^b	Rivière Mersey (Oglet, Royaume-Uni) ^c	Rivière Seine (Oissel, France) ^d	Estuaire Little egg (Tukerton, NJ, USA) ^e	Rivière Hugli (Calcutta, Inde) ^f	Rivière des perles (Chine/Hong Kong) ^g	Mer Noire (Odesa, Ukraine) ^h	Zone intertidale de Dar es Salaam (Tanzanie) ⁱ
16 HAP prioritaires de l'USEPA									
Naphtalène	nm ¹	29	56	68	10	31	nm	25	14
Acénaphène	nm	134	51	87	4	< 5	4	9	3
Acénaphthylène	nm	< ld ²	nm	63	nm	nm	4	< 0,5	1
Fluorène	nm	40	61	65	8	6	19	23	9
Anthracène	nm	180	82	152	10	16	10	37	190
Phénanthrène	nm	440	251	790	88	nm	44	130	170
Fluoranthène	nm	1050	261	1859	305	214	32	190	3100
Pyrène	nm	953	331	1418	187	144	35	160	470
Benzo[a]anthracène	43 000	425	201	1096	68	nm	20	3	1000
Chrysène	48 000	457	293	1151	208	137	17	46	1400
Benzo[b]fluoranthène	54 000	575	361	2034	228	nm	52	8	4100
Benzo[k]fluoranthène	26 000	234	185		129	41	14	185	1100
Benzo[a]pyrène	nm	564	332	1122	98	69	25	1	740
Dibenzo[ah]anthracène	5 000	312	85	183	25	29	14	0	77
Benzo[ghi]pérylène	nm	398	301	651	111	37	30	1	70
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	54 000	327	345	766	89	50	14	0	2400
Somme HAP	732 000	6118	3196	11505	1568	774	334	818	14844

^a (Barbee et al. 2008); ^b (Pozo et al. 2011); ^c (Vane et al. 2007); ^d (Cachot et al. 2006); ^e (Vane et al. 2008); ^f (Guzzella et al. 2005); ^g (Luo et al. 2006); ^h (Readman et al. 2002); ⁱ (Gaspere et al. 2009)

¹ non mesuré; ² inférieur à la limite de détection

1.3.3.2 Dégradation des HAP

Les sédiments contaminés en HAP sont une réelle menace pour l'ensemble des organismes qui y vivent ainsi que pour les organismes se nourrissant de proies benthiques. Contrairement à d'autres polluants organiques persistants, on ne détecte pas de bioamplification dans le cas des HAP. Abarnou et al. (2000) ont mis en évidence une concentration décroissante de HAP le long de la chaîne trophique. Les invertébrés aquatiques comme le phytoplancton, les bivalves et les gastéropodes, étant peu capables de biotransformer les xénobiotiques, les molécules ont tendance à se bioaccumuler. A l'inverse, les maillons trophiques en haut de chaîne présentent de meilleures capacités de métabolisation et d'élimination des HAP.

De plus, les HAP sont photosensibles et se dégradent sous l'action de la lumière solaire. Les réactions de photo-oxydation conduisent à la formation d'acides, alcools, cétones et autres composés qui peuvent être plus solubles dans l'eau et plus biodégradables (Lee 2003). En effet certaines populations de microorganismes présentes dans la colonne d'eau ainsi que dans les sédiments sont capables de biodégrader les HAP (Dutta &Harayama 2000). La température, la salinité, la pression, la concentration en oxygène sont des facteurs influant directement sur les mécanismes de biodégradation des HAP dans les milieux aquatiques (Berthe-Corti &Höpner 2005).

1.4 Réglementation des HAP

A l'instar de nombreux contaminants, on retrouve des HAP sur toute la surface du globe. Ils représentent un enjeu économique et environnemental à l'échelle nationale comme internationale. En atteste les différentes directives et réglementations mises en place en France et dans l'Union Européenne.

1.4.1 Directive Cadre sur l'Eau

La directive européenne cadre sur l'eau (DCE) (EC 2000), a été adoptée le 23 octobre 2000 et s'applique à tous les états membres de l'Union européenne. L'objectif général est l'atteinte du bon état écologique et chimique des masses d'eau européennes d'ici le mois de décembre 2015. Elle prend en compte les eaux intérieures de surface, les eaux de transition, les eaux marines côtières et les eaux souterraines. Suite à l'évaluation de la qualité de ces eaux, des actions pour lutter contre la pollution sont éventuellement mises en place. Il est de la responsabilité des états membres d'empêcher toute dégradation supplémentaire, de préserver et d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques. Les objectifs de la DCE sont les suivants :

- Recenser tous les bassins hydrographiques,
- Etablir un plan de gestion et un programme de mesure pour chaque bassin,
- Limiter, voire supprimer les rejets des substances polluantes prioritaires,
- Parvenir d'ici à 2015 au bon état chimique et écologique de l'ensemble des masses d'eau,
- Etablir un régime de sanctions en cas de non-respect de la DCE.

La première étape de la mise en place de la DCE consiste à réaliser un état des lieux des masses d'eaux. Les critères permettant de définir l'état écologique d'une masse d'eau comprennent :

- des critères biologiques : diversité et abondance du phytoplancton, des macro-algues, des angiospermes, des invertébrés et des poissons,

- des critères physico-chimiques : température, oxygène dissous, nutriments, turbidité,
- hydromorphologiques : profondeur, marnage, courant.

Dans le cadre du programme de surveillance de la DCE, 41 substances sont suivies. Deux normes de qualité environnementales (NQE) ont été définies pour chacune des substances :

- la NQE représentant la concentration maximale admissible,
- et la NQE représentant la concentration moyenne annuelle à ne pas dépasser.

Cette directive ne prend en compte que la phase particulaire et dissoute de la colonne d'eau et ne prend pas en compte les concentrations dans le sédiment ni dans le biota. Aucune NQE n'a encore été établie pour le compartiment sédimentaire.

Parmi les substances surveillées certaines sont classées prioritaires (SP) ou dangereuses prioritaires (SDP). La directive 2008/105/CE (EC 2008a) impose la réduction progressive de la pollution par les substances classées prioritaires. A plus long terme elle réclame également la suppression des rejets de substances classées dangereuses prioritaires. Les substances sont réparties en 4 familles : les pesticides, les métaux lourds, les polluants industriels et les autres polluants. Les HAP font partis de cette liste de 41 substances prioritaires et dangereuses prioritaires qui est mise à jour tous les 4 ans (**Tableau 4**).

Tableau 4. Liste des HAP inclus dans la liste des substances polluantes prioritaires (SP) et dangereuses prioritaires (SDP) de la DCE.

HAP	Statut	NQE (moyenne annuelle à ne pas dépasser pour les eaux de surface intérieures) ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (EC 2008a)
Naphtalène	SP	2,4
Anthracène	SDP	0,1
Fluoranthène	SDP	0,1
Benzo[a]pyrène	SDP	0,05
Benzo[b]fluoranthène+ benzo[k]fluoranthène	SDP	$\Sigma = 0,003$
Benzo[ghi]pérylène+ indéno[1,2,3-cd]pyrène	SDP	$\Sigma = 0,002$

Parmi les actions menées en France pour appliquer la DCE on compte l'action nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans l'Eau par les installations classées (3RSDE). Cette action a été mise en place en 2002 par institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS 2008). Elle se focalise entre autre sur les HAP prioritaires et dangereux prioritaires de la DCE. Les objectifs sont de :

- rechercher les rejets de substances pour environ 3000 établissements,
- identifier parmi ces rejets lesquels présentent un risque pour l'environnement,
- et prendre des mesures adéquates à la réduction de ces rejets.

Par ailleurs, la directive dite stratégie pour le milieu marin (SMM) a été établie pour compléter la DCE et assurer la protection et la gestion des eaux hauturières (EC 2008b). L'objectif général est l'atteinte du bon état écologique des eaux marines européennes d'ici 2020. Ces eaux se divisent en 4 régions : mer Baltique, Atlantique Nord-est, mer Méditerranée et mer Noire. Les états membres doivent en premier lieu évaluer l'état

écologique actuel des eaux marines. Puis les états doivent déterminer le bon état écologique pour chaque bassin hydrographique. Des objectifs clairs et des indicateurs doivent ensuite être définis. Et pour finir les états doivent élaborer des programmes de surveillance.

1.4.2 Réglementation REACH

Depuis plusieurs dizaines d'années de nombreuses substances chimiques ont été conçues et placées sur le marché européen, parfois en quantité très importante, et sans information suffisante sur les risques possibles de ces substances envers la santé humaine et l'environnement. L'Union européenne a mis en place une réglementation pour le suivi des produits chimiques en Europe. La réglementation européenne REACH, entrée en vigueur le 18 décembre 2006, œuvre pour l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation, et la restriction des produits chimiques sur le marché européen (*Registration Evaluation Authorization and restriction of Chemicals*) (EC 2006).

Ce règlement contraint les industries chimiques productrices et importatrices à informer l'agence européenne ECHA (*European Chemicals Agency*) des propriétés et des risques des produits chimiques utilisés. Pour ce faire, le producteur ou importateur européen de la substance doit détailler dans un dossier technique (*technical dossier*) les propriétés physico-chimiques, les utilisations possibles, les précautions d'utilisation, les réponses aux tests de toxicité aiguës, de mutagénicité, de génotoxicité, etc. Le type et le nombre d'informations requis par l'ECHA dépend du volume de production ou d'importation de la substance chimique. Par exemple, les composés produits ou importés à plus de 100 tonnes par an doivent être testés par un test embryon-larvaire sur poisson.

L'ECHA aide les déclarants à compiler les informations et promeut l'utilisation sans risque des produits chimiques. Depuis la mise en place de la réglementation, c'est aux producteurs et importateurs de gérer et de limiter les risques posés par les produits. Cela incite également l'innovation pour identifier des molécules de substitution aux molécules toxiques.

Cette nouvelle réglementation REACH dresse plusieurs objectifs:

- L'évaluation et l'enregistrement systématique de tous les produits importés ou produits à plus de 1 tonne par an
- La protection de la santé humaine et de l'environnement,
- Le maintien et l'encouragement de la compétitivité entre les industries chimiques européennes,
- La prévention de la fragmentation du marché intérieur européen,
- L'augmentation de la transparence du marché,
- Le recours privilégié à des tests de toxicité sur espèces non animales

La réglementation REACH encourage l'utilisation de méthodes alternatives pour l'évaluation des substances toxiques dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les tests de toxicité.

Pour le cas des substances les plus dangereuses, leur remplacement progressif est demandé aux industries lorsque des substances de substitution ont été identifiées. Par exemple la réglementation REACH restreint l'utilisation de 8 HAP dans les pneumatiques et les huiles de dilution (EC 2006). La mise sur le marché de pneumatiques dans l'Union européenne ne sera pas autorisée si les 8 HAP excèdent les seuils de concentration présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Restriction de l'utilisation de 8 HAP par REACH dans les pneumatiques et huiles de dilution et matériaux dont l'utilisation peut conduire à un contact avec la peau de plus de 30s.

Composé	Limite
Benzo[<i>a</i>]pyrène	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div> <p>1 mg.kg⁻¹</p> <p>La somme des 8 HAP < 10 mg.kg⁻¹</p> </div> </div>
Benzo[<i>e</i>]pyrène	
Benzo[<i>a</i>]anthracène	
Chrysène	
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	
Benzo[<i>j</i>]fluoranthène	
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène	

Depuis 2008, l'anthracène est un HAP candidat à la liste des substances extrêmement préoccupantes. En effet ce composé est reconnu toxique, persistant et se bioaccumulant, d'après les critères de l'annexe XIII de la réglementation (EC 2006).

Les réglementations DCE, REACH ou de l'US EPA ne prennent pas en considération les HAP alkylés.

1.5 Méthodes d'évaluation de la toxicité des HAP

Les HAP ne sont jamais présents dans l'environnement en composés individuels mais sous forme de mélanges complexes. L'évaluation de la toxicité des mélanges de HAP est indispensable pour dresser un état des lieux du risque chimique dans les écosystèmes et ainsi limiter l'impact que peuvent avoir les substances dangereuses sur l'environnement. Chacune des molécules composant un mélange présente des propriétés physico-chimiques différentes. De ce fait la distribution et la dégradation dans l'environnement des molécules, ainsi que leur toxicité sont spécifiques à chaque composé.

1.5.1 Facteurs d'équivalent toxique

La méthode des facteurs d'équivalent toxique (FET) a été développée afin de classer les composés suivant leur potentiel toxique par rapport à un composé de référence. Le FET du composé de référence est arbitrairement fixé à 1, puis le FET des autres composés en découle. La méthode a originellement été établie pour les PCBs avec pour composé de référence la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (Safe 1993). Cette méthode fait l'hypothèse du simple effet additif des mélanges. Dans le cas de l'évaluation de la toxicité d'un mélange, une valeur TEF est attribuée à chaque composé du mélange, ces valeurs sont sommées, pondérées par la concentration du composé dans le mélange :

$$TEQ_{\text{mélange}} = \sum FET_i \times [HAP_i]$$

Où *i* correspond à chaque HAP constituant le mélange.

Cette méthode de calcul des TEQ est peu coûteuse et permet d'évaluer le risque global d'un mélange et non de chaque composé séparément.

L'INERIS propose un classement des FET basé sur le potentiel cancérigène des HAP avec le benzo[a]pyrène comme composé de référence (INERIS 2003). Un autre classement des FETs a également été avancé vis-à-vis des poissons. Il est basé cette fois-ci sur le potentiel agoniste des HAP vis-à-vis du récepteur aryl hydrocarbure (AhR) (Barron et al. 2004b). Ce dernier classement considère que les HAP ont un mode d'action similaire aux PCBs et composés *dioxine-like*, c'est pourquoi le TCDD a été sélectionné comme composé de référence. Toutefois certains HAP de faibles poids moléculaires sont faiblement agonistes de l'AhR et se sont avérés inactifs dans le modèle développé. Ces deux classements de FET sont proposés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Classement FETs des HAP en fonction de leur potentiel cancérigène et agoniste de l'AhR.

HAP	Cancérogénicité FET / BaP (INERIS 2003)	Potentiel agoniste du récepteur Ah FET / TCDD (Barron et al. 2004b)
Naphtalène	0,001	Inactif
Acénaphène	0,001	Inactif
Acénaphthylène	0,001	Inactif
Fluorène	0,001	Inactif
Anthracène	0,01	Inactif
Phénanthrène	0,001	Inactif
Fluoranthène	0,001	2×10^{-9}
Pyrène	0,001	385×10^{-9}
Benzo[a]anthracène	0,1	200000×10^{-9}
Chrysène	0,01	65900×10^{-9}
Benzo[b]fluoranthène	0,1	166000×10^{-9}
Benzo[k]fluoranthène	0,1	1280000×10^{-9}
Benzo[a]pyrène	1	243750×10^{-9}
Dibenzo[ah]anthracène	1	272000×10^{-9}
Benzo[ghi]pérylène	0,01	10200×10^{-9}
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0,1	1880000×10^{-9}
2-méthylphénanthrène	nd ¹	39500×10^{-9}
5-Méthylchrysènes	nd	646000×10^{-9}

¹non défini

1.5.2 Calcul de risques environnementaux

La directive européenne 1488/94/EC (EC 1994) recommande à travers le *Technical Guidance Document* le recours au calcul de risque des substances chimiques afin d'évaluer les dangers pour l'homme et l'environnement. Le risque environnemental est calculé pour une substance donnée suivant la formule suivante :

$$\text{Quotient de risque} = \text{PEC/PNEC}$$

Où PEC (*Predicted Environmental Concentration*) est la concentration prévisible du composé dans l'environnement et PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) est la plus forte

concentration n'induisant pas d'effet. Ces valeurs peuvent être calculées pour la colonne d'eau mais également pour le compartiment sédimentaire. Si pour une substance donnée :

- le quotient de risque (QR) < 1 , alors la PEC est inférieure à la PNEC et la substance présente peu ou pas de risque,
- QR = 1, les valeurs de PEC et PNEC sont proches, des risques sont possibles et l'évaluation du risque nécessite d'être affinée,
- QR > 1 , alors la PEC est supérieure à la PNEC et la substance présente un risque avéré pour l'environnement.

Les valeurs de $PNEC_{\text{eau}}$ sont calculées à partir de valeurs obtenues pour des bioessais poissons, daphnies et/ou algues. Pour la $PNEC_{\text{sédiment}}$, les valeurs sont obtenues pour des espèces présentant différents régimes alimentaire et différents mode de vie. Si le jeu de données est trop faible, les valeurs de seuil de toxicité des bioessais sont multipliées par un facteur d'extrapolation pouvant aller de 10 à 1000.

Tableau 7. Valeurs de PNEC calculées pour 5 HAP modèles vis-à-vis de la contamination de l'estuaire de la Seine (Lachambre & Fisson 2007).

HAP	$PNEC_{\text{eau}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$PNEC_{\text{sédiment}} (\text{ng.g}^{-1})$
Acénaphthène	3,7 (10) ^a	44,4 (1000)
Anthracène	0,06 (10)	45,2 (-)
Benzo[a]pyrène	0,05 (10)	
Benzo[k]fluoranthène	0,04 (10)	1800 (-)
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	$2,7 \times 10^{-3}$ (100)	
Fluoranthène	0,1 (10)	2,3 (1000)
Naphtalène	12 (10)	175 (-)

^a le nombre entre parenthèse indique le facteur d'extrapolation utilisé pour le calcul de PNEC

1.5.3 Evaluation de la toxicité de mélange d'hydrocarbures

On distingue deux méthodes d'évaluation de la toxicité de mélange d'hydrocarbures : la méthode des hydrocarbures pétroliers totaux et la méthode des blocs d'hydrocarbures.

La **méthode des hydrocarbures pétroliers totaux** propose une approche qui vise à évaluer le risque de la contamination des écosystèmes aquatiques par des mélanges d'hydrocarbures (Gustafson et al. 1997). Elle se base sur une modélisation des partages des molécules dans les trois compartiments air, sol et eau. Les estimations des concentrations des hydrocarbures dans les différents compartiments sont calculées à partir de facteurs de volatilisation et de lixiviation. Afin de faciliter le calcul, les composés ayant des facteurs similaires sont regroupés. Cette méthode est appropriée pour des contaminations avec un faible nombre de composés.

La **méthode des blocs d'hydrocarbures** a également été développée pour évaluer les risques des mélanges complexes pour l'environnement et en particulier des mélanges hydrocarbures (van de Meent et al. 2010). Malgré le fait que les propriétés physico-chimiques diffèrent entre les molécules constituant un mélange d'hydrocarbures, certaines présentent des structures similaires. Il est alors possible de les regrouper en bloc. Cette méthode peut être appliquée à un calcul de risques environnementaux pour lequel une PEC et une PNEC sont

estimés par bloc d'hydrocarbures. Le quotient de risque dérive alors de ratios PEC/PNEC de chaque bloc. Cette méthode suppose des effets additifs des hydrocarbures. L'équation suivant en découle :

$$QR_{\text{mélange}} = \sum QR_i = \sum PEC_i / PNEC_i$$

Où i correspond à chaque bloc d'hydrocarbure.

Ainsi le QR du fioul *Erika* équivalent à 4,5 a été calculé suivant cette méthode pour évaluer la contamination chronique après le naufrage du pétrolier dans le compartiment aquatique à proximité des nappes de fioul. Puisque le QR est supérieur à 1, la fraction dissoute des hydrocarbures présente un risque avéré pour les espèces aquatiques (INERIS 2000).

2 Sensibilité des stades précoces de développement de poissons aux HAP

2.1 Définition des jeunes stades de développement

2.1.1 Réglementation des tests embryo-larvaires poissons

La réglementation REACH requiert un nombre croissant d'analyses toxicologiques et donc d'animaux utilisés à ces fins. Cependant REACH recommande d'appliquer la directive européenne 2010/63/EU (EC 2010). Dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux utilisés, cette réglementation encourage à la fois la mise en commun des données des industriels afin de réduire le nombre de tests, et l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale (EC 2006).

La directive européenne sur l'expérimentation animale protège les stades avancés de développement de poissons et limite leur utilisation à des fins scientifiques (**Figure 3**). Les expérimentations sur les premiers stades de développement sont considérées équivalentes à des expérimentations *in vitro* et sont ainsi exclues de cette réglementation. Ces stades précoces de développement (SPD) considèrent les stades antérieurs au début de l'alimentation exogène. Ils incluent donc les stades gamètes, embryon, et éléutheroembryon (larve vésiculée).

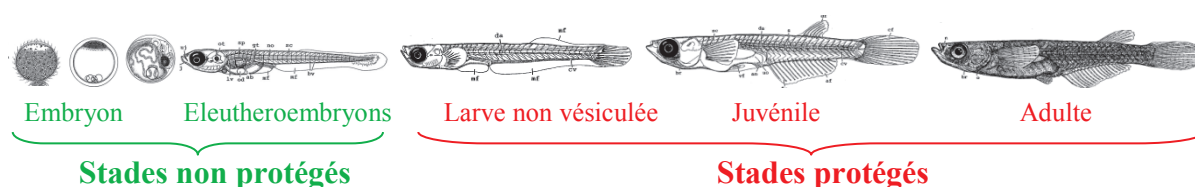


Figure 3. Protection des différents stades de développement de poissons par la législation européenne, croquis d'après (Iwamatsu 2004).

L'utilisation de tests embryo-larvaires poissons apparaît comme une méthode alternative à l'expérimentation animale massive. Dans l'annexe IX, le règlement REACH prescrit l'utilisation de ces tests pour l'évaluation de la toxicité des substances fabriquées ou importées à plus de 100 tonnes par an dans l'Union Européenne (EC 2006).

2.1.1.1 Le principe des 3R

En 1959, Russell et Burch introduisaient le principe des 3R, «*reduce, refine, and replace*» (Russell & Burch 1959). Ce principe est à l'origine de la démarche éthique de l'expérimentation animale en Amérique du Nord. Il est à présent requis par la directive européenne 2010/63/EU sur l'expérimentation animale (EC 2010). Ce principe se base sur la réduction, le raffinement, et le remplacement des animaux utilisés à des fins expérimentales :

- la réduction fait référence aux méthodes qui minimisent l'utilisation d'animaux tout en permettant un niveau comparable d'information
- le raffinement fait référence à l'amélioration des conditions et techniques d'expérimentation afin de minimiser la douleur, le stress, et l'inconfort ressentis par les animaux
- le remplacement fait référence à l'utilisation de bioessais sans animaux ou le remplacement des animaux définis comme protégés.

Les tests embryo-larvaires respectent la règle des « 3Rs » en remplaçant les stades protégés par des stades non protégés, en réduisant le nombre d'animaux des stades protégés requis lorsque les paramètres observés des tests sont sublétaux et non-invasifs, et en limitant la manipulation des animaux.

2.1.1.2 OCDE

Il existe à l'heure actuelle trois tests de toxicité sur poissons prenant en compte les jeunes stades précoces de développement proposés par l'OCDE, l'OCDE n°210, 212 et 236 (OCDE 1992, 1998, 2013). Ils sont détaillés dans le **Tableau 8**.

L'OCDE 210 « essai de toxicité aux premiers stades de vie de poisson », est un test de toxicité chronique du stade embryonnaire au stade larvaire avésiculé. Les SPD de poissons sont exposés par voie aqueuse à une substance dissoute dans des conditions de renouvellement d'eau continu ou semi-statique. Différents critères sont à respecter afin de valider les tests : une mortalité limitée dans les groupes témoins, une concentration en oxygène dissous supérieure à 60 % de la valeur de saturation, la minimisation des variations de la température et de la concentration de la substance pendant l'exposition et l'utilisation d'un témoin solvant seul afin de prouver son innocuité. Des effets létaux et sublétaux sont évalués par des comparaisons aux valeurs des groupes témoins. La concentration la plus basse à laquelle un effet est observé LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) est déterminée ainsi que la concentration la plus élevée ne provoquant pas d'effet NOEC (*No Observed Effect Concentration*).

L'OCDE 212 « essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin de poisson » consiste en un test de toxicité de courte durée sur les embryons et larves vésiculées de poisson. Contrairement à l'OCDE 210, l'OCDE 212 ne prend en compte que des stades non protégés par la législation. Ainsi l'OCDE 212 peut être appliquée à des espèces pour lesquels le maintien en vie est difficile lors du passage de l'alimentation endogène à exogène. De même que pour le test précédent, des valeurs de LOEC et NOEC sont déterminées en fin de test.

L'OCDE 236 propose un test de toxicité aigu sur embryons de poisson. Ce test applique la directive OCDE 203 « poisson, test de toxicité aiguë » sur poissons juvéniles, aux SPD de poisson zèbre. Il permet d'évaluer la toxicité aiguë de substances chimiques ou d'effluents et propose d'autres paramètres de toxicité que la létalité, classiquement observée, comme par exemple la formation des somites, le détachement de la queue, le rythme cardiaque et la coagulation des œufs. En fin de test, le seuil de létalité de l'échantillon testé est calculé.

Tableau 8. Comparaison des trois tests normalisés incluant des stades précoces de développement de poissons.

	OCDE 210 (1992)	OCDE 212 (1998)	OCDE 236 (OCDE 2013)
Stades concernés	Embryon et larve non vésiculée (stades non protégés)	Embryon, larve non vésiculée et larve vésiculée (stades protégés et non protégés)	Embryon (stades non protégés)
Exposition	Composé dissous dans l'eau	Composé dissous dans l'eau	Composé dissous dans l'eau
Critères de validité	Survie témoins > ~70 % [O ₂] > 60 % Δ [substance] < \pm 20 % Δ T < \pm 1,5 % proposer témoin solvant	Survie témoins > ~70 % [O ₂] > 60 % Δ T < \pm 1,5 %	Taux de fertilisation > 70 % T _{eau} = 26 \pm 1 °C Survie témoins > 90%
Paramètres observés	<u>Létaux</u> Mortalité Taux d'éclosion <u>Sous-létaux</u> Temps d'éclosion Longueur et poids des animaux Nombre de larves déformées Nombre de poissons présentant un comportement anormal	<u>Létaux</u> Mortalité Taux d'éclosion <u>Sous-létaux</u> Temps d'éclosion Longueur et poids des animaux Nombre de larves déformées Nombre de poissons présentant un comportement anormal	<u>Létaux</u> Mortalité (coagulation des œufs, manque de somite, absence de battement cardiaque, non détachement de la queue)
Espèces recommandées	<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Pimephales promelas</i> <i>Danio rerio</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Cyprinus carpio</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Pimephales promelas</i> <i>Danio rerio</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Cyprinus carpio</i>	<i>Danio rerio</i>

2.1.2 Domaine d'application des tests embryo-larvaires

Les tests embryo-larvaires poissons s'appliquent principalement à deux domaines : la toxicologie, qui correspond à l'évaluation de la toxicité de substances chimiques ; et l'écotoxicologie, qui correspond à l'évaluation du risque de ces substances pour l'environnement.

Ces tests embryo-larvaires proposent une méthode alternative aux tests de toxicité classiquement utilisés vis-à-vis de la législation. Ainsi, ils répondent à l'augmentation de la demande de tests de toxicité requis par les nouvelles directives et réglementations en vigueur tel que REACH (EC 2006). Cependant les tests normalisés proposés par l'OCDE sont peu adaptés aux molécules faiblement solubles dans l'eau. Le solvant utilisé pour augmenter la solubilité d'une substance peut également modifier la biodisponibilité de la substance pour l'organisme.

Les tests sur SPD de poisson sont aussi applicables au suivi de la contamination de masses d'eau, comme recommandé par exemple par la DCE (EC 2000). Néanmoins, l'exposition par voie aqueuse uniquement ne propose pas un scénario réaliste de la contamination environnementale par des composés hydrophobes. Ces derniers ont tendance à s'adsorber aux matières en suspension dans la colonne d'eau et aux particules sédimentaires. Les polluants séquestrés dans les sédiments continuent à impacter l'environnement même si parfois la colonne d'eau semble être indemne de contamination d'après les critères d'évaluation. La faune benthique est directement menacée par cette pollution. Les sédiments représentent alors une réelle menace pour la qualité des écosystèmes aquatiques.

C'est pourquoi des tests embryo-larvaires avec exposition au contact d'un sédiment contaminé ont été développés à la fois pour proposer une méthode d'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes mais aussi pour estimer la qualité des écosystèmes aquatiques (Cachot et al. 2007, Hallare et al. 2011, Hollert et al. 2003, Vicquelin et al. 2011). Des embryons de poissons sont alors exposés au sédiment naturel à évaluer ou à un sédiment vierge enrobé avec la substance à tester (Hallare et al. 2011, Hollert et al. 2003). L'exposition par voie sédimentaire permet d'étudier les effets des sédiments et des particules en suspension, en se focalisant sur la fraction biodisponible des contaminants. De nouveaux paramètres sont aussi régulièrement proposés afin d'affiner la sensibilité de ces tests (Bartzke et al. 2010). La réalisation de tests de génotoxicité sur les organismes ou d'analyse d'activité génique apporte des informations supplémentaires sur les mécanismes d'action des composés étudiés (Hallare et al. 2011, Kosmehl et al. 2006, Morin et al. 2011).

Les tests de SPD avec exposition par sédiment contact ont déjà été réalisés sur différentes espèces dont le poisson zèbre (Hollert et al. 2003, Rocha et al. 2011), le médaka japonais (Cachot et al. 2007, Vicquelin et al. 2011), et des salmonidés (Barbee et al. 2008, Karlsson et al. 2008). D'après la revue d'Hallare et al. (2011), 42 % des tests d'évaluation de la toxicité des sédiments avec les SPD de poissons étudient le sédiment en entier, 32 % sont des études de mise en cage *in situ*, 13 % sont des études d'extraits de sédiments, 7 % d'eau interstitielle, et 6 % d'élutriats. Ces tests peuvent également être appliqués à la technique EDA (*Effect Directed Analysis*) qui, brièvement, consiste en une analyse dirigée par les bioessais où l'échantillon de sédiment est fractionné et la toxicité de chacune de ces fractions est étudiée plutôt que la toxicité du sédiment en entier (Sundberg et al. 2005). D'une manière générale, ces tests d'étude de toxicité de sédiment sont inclus dans un processus complet d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (Ahlf et al. 2002, Chapman et al. 2002).

Plusieurs travaux ont également appliqué ces tests embryo-larvaires en conditions naturelles. (Bony et al. 2008) ont exposés des embryons de poissons pendant tout la durée de leur développement dans la rivière Morcille contaminée par des pesticides viticoles. Pour cette étude une espèce représentative des cours d'eau français la truite fario *Salmo trutta fario* a été utilisée comme espèce modèle.

2.2 Contamination et métabolisation des HAP

2.2.1 Biodisponibilité des HAP

Les HAP sont retrouvés dans le sédiment et dans la phase particulaire de la colonne d'eau (Barbee et al. 2008, Cailleaud et al. 2007, Depree 2008). Les processus de sorption et de désorption des HAP, depuis le sédiment et les particules, contrôlent la concentration en HAP dans l'eau interstitielle qui occupe les espaces entre les particules (Cailleaud et al. 2007). De ce fait ces processus contrôlent également la fraction de HAP qui peut potentiellement être absorbée pour absorption par l'organisme, appelée fraction biodisponible.

Ces processus dépendent de nombreux paramètres intrinsèques et extrinsèques aux molécules (**Figure 4**). En effet, les paramètres physico-chimiques semblent être les premiers facteurs modifiant les capacités de sorption des molécules. La masse moléculaire et les coefficients de partage K_{oc} et K_{ow} présentés précédemment, définissent les affinités des HAP pour les matières solides ou hydrophobes. Les propriétés du sédiment et de l'eau interstitielle telles que la présence de matière organique, la taille des particules, la température, le pH, la salinité, modifient également ces processus d'adsorption et la dégradation des HAP (Chapman & Wang 2001, Guasch et al. 2012). Plus l'affinité des HAP pour la matière organique sera importante, comme dans le cas des contaminations de longue date, moins les molécules auront tendance à se désorber.

De plus des causes extérieures aux propriétés des molécules modifient la biodisponibilité des contaminants qui remettent en suspension les sédiments et favorisent la re-solubilisation des HAP. Citons par exemple : les activités de dragage, les tempêtes, les inondations, les marées et le phénomène de bioturbation (Cailleaud et al. 2009, Palmqvist et al. 2006, Roberts 2012, Sundberg et al. 2007, Wölz et al. 2008).

2.2.2 Voies de contaminations des HAP

La contamination des SPD de poissons par les HAP se fait soit par voie maternelle, soit par exposition directe.

2.2.2.1 Contamination par la voie maternelle

La qualité de ponte est directement liée à l'état sanitaire des femelles (Solemdal 1997). Les poissons adultes accumulent les composés organiques en majorité dans les gonades (Carls et al. 2000). Lors de la vitellogénèse, un transfert de lipides a lieu pour former le vitellus. Pour le cas d'une mère contaminée, ces lipides peuvent potentiellement être associés à des HAP qui se retrouveront ensuite dans les gamètes puis dans l'embryon une fois fertilisé. Par la suite, l'embryon va puiser les ressources en nutriments nécessaires à son développement dans le sac vitellin contaminé, qui représente alors la première source d'exposition de l'individu (Nye et al. 2007). C'est le transfert par **voie maternelle**. Tilghman Hall et Oris ont mis en

évidence la répercussion d'une exposition maternelle à l'anthracène sur la survie des œufs et larves de tête-de-boule *Pimephales promelas* ainsi que des effets tératogènes (Tilghman Hall & Oris 1991). De la même manière (Sundberg et al. 2007) ont démontré que des adduits à l'ADN chez les femelles étaient directement corrélés aux concentrations de HAP dans les œufs.

La contribution de la voie maternelle dans la contamination des œufs par les milieux naturels pollués a été évaluée en laboratoire. L'exposition par voie directe de hareng du pacifique *Clupea pallasii* a causé moins d'effets néfastes que la voie maternelle (Carls et al. 2000). Alors qu'aucune différence entre ces deux voies d'exposition n'a été rapportée pour les SPD de choquemort *Fundulus heteroclitus* (Nye et al. 2007).

En conditions contrôlées, il est possible de mimer la voie maternelle par des nano-injections de contaminant dans le vitellus (Wilson & Tillitt 1996), ou par une exposition topique (Helmstetter & Alden 1995).

2.2.2.2 Contamination par voie directe

Une fois l'œuf pondu il est directement exposé à la colonne d'eau et/ou au sédiment éventuellement contaminés (**Figure 4**). Puis après le début de l'alimentation exogène, l'alimentation peut aussi être une source de contamination (Couillard et al. 2009). Cependant cette étude bibliographique se concentre sur les SPD de poissons qui incluent uniquement les individus ayant recours à une alimentation endogène, il n'en sera donc pas question ici.

Via la colonne d'eau

La contamination des embryons et des larves par une colonne d'eau contaminée en HAP peut conduire à l'assimilation des composés dissous. Suite au naufrage de l'*Exxon Valdez* au large des côtes de l'Alaska en mars 1989, de nombreuses études ont été réalisées sur les SPD de poissons. Le transfert des HAP présents dans la colonne d'eau vers les œufs et larves de différentes espèces de poissons a alors été mis en évidence (Barron et al. 2004a, Carls et al. 1999, Carls & Thedinga 2010). Les propriétés hydrophobes des HAP impliquent aussi leur forte adsorption sur les particules présentes dans la colonne d'eau (Cailleaud et al. 2007). L'assimilation des HAP par les organismes peut également provenir de ces particules (Incardona et al. 2004). (Carls et al. 2008) ont récemment suggéré que la toxicité des HAP était dépendante de la dissolution dans l'eau de ces derniers. La dissolution des hydrocarbures induirait d'avantage d'effets toxiques sur les larves de poisson zèbre qu'un contact direct avec des particules de pétrole.

L'étude de la contamination des HAP via la colonne d'eau est couramment reproduite en laboratoire par une exposition aux composés dissous dans l'eau, cependant elle est limitée par la faible solubilité des composés.

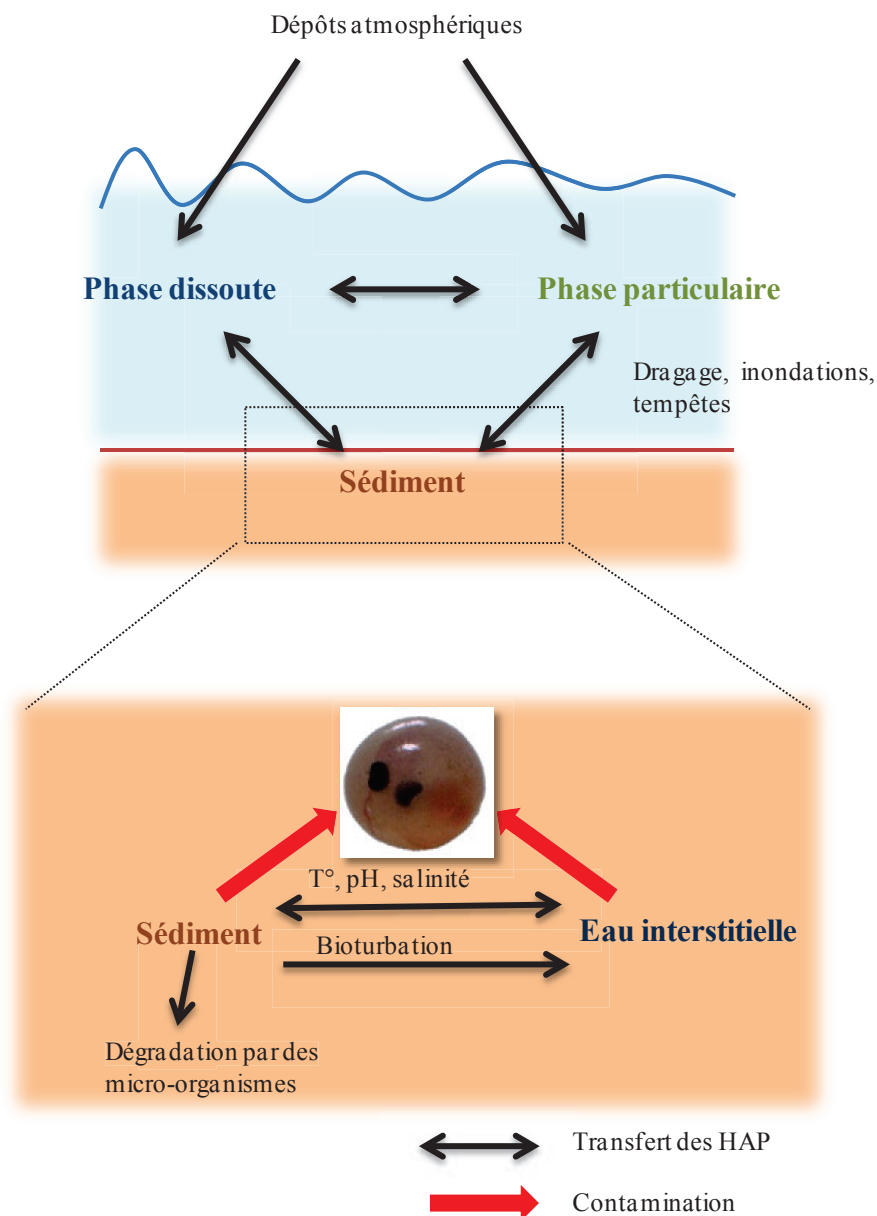


Figure 4. Transfert des HAP à travers les différents compartiments et contamination des embryons de poissons.

Via le sédiment

De par leur caractère hydrophobe, les HAP s'adsorbent aux particules et s'accumulent dans les sédiments. Ainsi dès le stade embryonnaire, les organismes peuvent être directement exposés aux matrices sédimentaires contaminées. Il est cependant délicat de distinguer la contribution de la contamination par la colonne d'eau, de la contamination par contact direct avec le sédiment. D'autre part, la composition de l'eau interstitielle du sédiment est différente de celle de la colonne d'eau, avec des concentrations plus importantes en matière organique et de surcroît en contaminant. Les organismes aquatiques sembleraient être plus sensibles aux HAP dissous (Carls & Meador 2009, Geffard et al. 2003) mais d'autres études, dont celle de (Kocan et al. 1996), soulignent l'apport de contaminant évident par le sédiment. La contamination par voie directe via le sédiment peut être reproduite en conditions de

laboratoire en incubant les embryons directement au contact du sédiment (Cachot et al. 2007, Hallare et al. 2005).

2.2.3 Bioaccumulation des HAP

La bioaccumulation est le processus d'absorption et d'internalisation d'une substance par un organisme. Malgré leur caractère hydrophobe élevé, les HAP réussissent à traverser la barrière physique que représente le chorion. Ces molécules ont été mesurées dans les tissus des embryons (McElroy et al. 2006). Les embryons et larves de poissons sont capables de bioaccumuler les HAP dès les premières heures de développement comme l'illustre la **Figure 5** (Hornung et al. 2004). Le signal le plus intense a été observé dans les gouttelettes d'huiles situées à l'intérieur du sac vitellin. Le système biliaire hépatique, la vésicule biliaire, et le tube intestinal ont aussi montré une forte accumulation de signal fluorescent. Les HAP traversent les membranes biologiques et de se bioaccumulent dans les tissus et le sac vitellin en majorité lipophiles. La contamination des embryons s'opère par un transport passifs des molécules, contrôlé par leur coefficient de partage log Kow (Helmstetter & Alden 1995). Les HAP de haut poids moléculaires sont cependant limité par leur solubilité et leur biodisponibilité reste faible pour les SPD de poissons (Billiard et al. 2008, Brannon et al. 2012). La teneur en HAP dans les tissus des organismes est déterminée par la cinétique d'absorption et d'élimination spécifiques pour chaque HAP et chaque organisme (Djomo et al. 1996, Van der Oost et al. 2003).

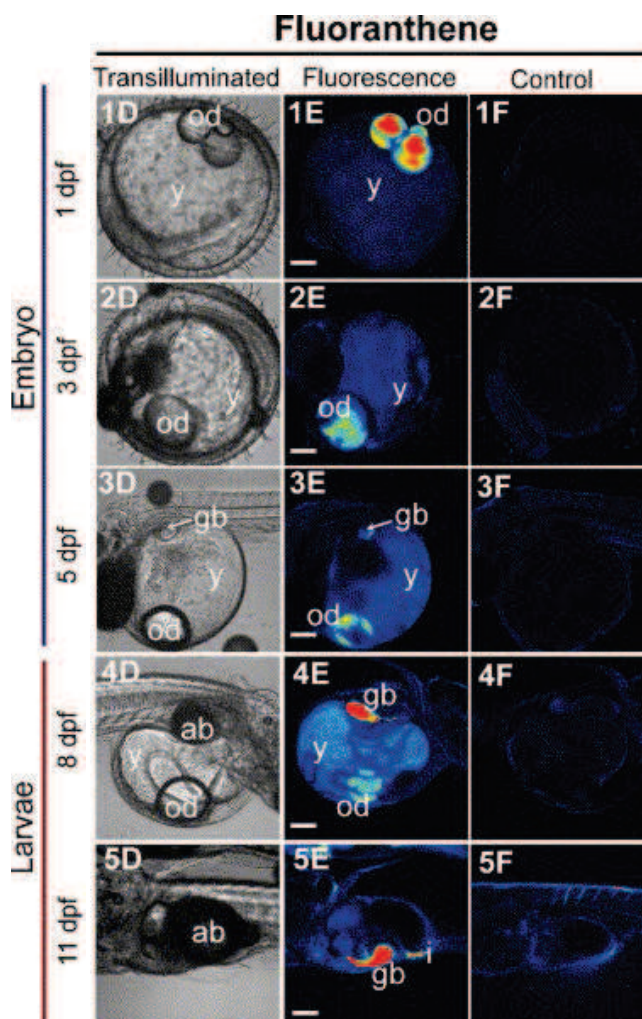


Figure 5. Bioaccumulation du fluoranthène chez les embryons et larves de médaka japonais. Abréviations : od – gouttelettes d’huile, y – vitellus sans les gouttelettes d’huile, gb – vésicule biliaire, i - intestin, ab – vessie natatoire. Les couleurs des images correspondent pour le rouge à un signal intense, pour le jaune à un signal modéré et le plus faible signal en bleu. (Hornung et al. 2004)

2.2.4 Métabolisation et élimination des HAP

Lorsqu’un organisme est exposé à un contaminant, des réactions enzymatiques s’opèrent dans le but d’essayer de l’éliminer. Le mécanisme de biotransformation a pour but de transformer les HAP parents en métabolites plus polaires favorisant leur excrétion par la bile ou l’urine. Le processus de biotransformation augmente la solubilité de la substance en transformant le HAP initialement hydrophobe en métabolite plus polaire donc plus hydrosoluble. Le métabolite formé est ainsi stocké dans la bile jusqu’à son excrétion (Van der Oost et al. 2003).

On peut distinguer deux phases dans le processus de biotransformation: la phase I de biotransformation consistant en une réaction d’oxydation, de réduction ou d’hydrolyse ; et la phase II qui conjugue les produits oxygénés (**Figure 6**). On parle aussi de phase III pour les métabolites éliminés par la bile qui sont pris en charge par des protéines de transport membranaires,. Ces réactions conduisent à une augmentation de la solubilité des produits finaux, ce qui facilite leur excrétion. Chez les embryons et larves de poissons ces réactions ont été identifiées en premier lieu au niveau des zones hépatiques (Hornung et al. 2007). Cette activité métabolique réduit la teneur en HAP dans les tissus de l’organisme et par conséquent limite le stockage des contaminants.

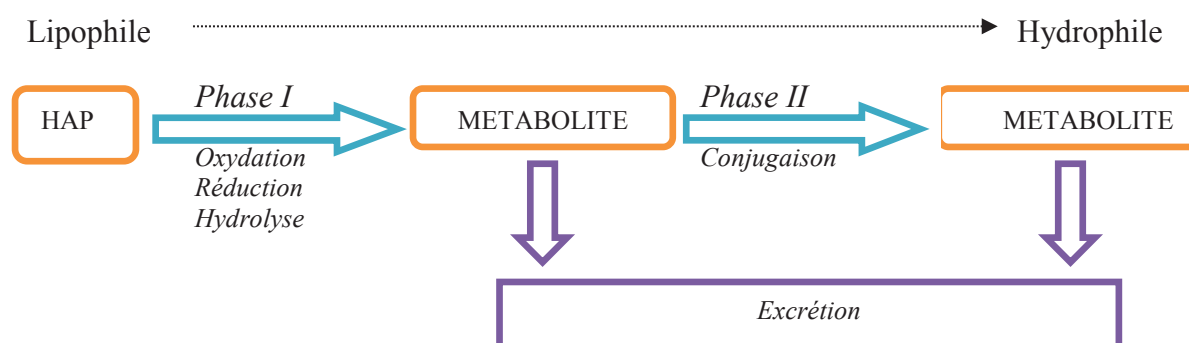


Figure 6. Synoptique du processus de biotransformation des HAP.

Paradoxalement la biotransformation de la molécule peut aboutir à la formation d’un intermédiaire qui peut être plus toxique que le composé parent. C’est le cas du benzo[a]pyrène dont la biotransformation, intensément décrite dans la littérature, conduit à la formation de dérivés époxydes qui se lient à l’ADN (Schlenk et al. 2008). De la même manière, les HAP alkylés forment des métabolites oxygénés toxiques pour les SPD de poisson (Fallahrafti et al. 2012, Turcotte et al. 2011).

2.2.4.1 Phase I de fonctionnalisation

La phase I de fonctionnalisation consiste à former des métabolites électrophiles polarisés par l'action d'enzymes catalysant des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Les HAP parents sont métabolisés en molécules plus hydrophiles de type phénol, époxyde, voire diol-époxyde.

Chez les poissons, la phase I est majoritairement conduite par des enzymes inductibles de la famille des cytochromes P450 en particulier le CYP1A. Ces enzymes sont localisées au niveau des membranes du réticulum endoplasmique lisse, situé en majorité dans le foie, mais sont également présentes dans d'autres organes. Elles sont exprimées et fonctionnelles dès les premiers stades de développement de poissons. Ces enzymes catalysent l'ajout d'un atome d'oxygène à la molécule d'HAP à travers une réaction dépendante de la NADPH. La protéine CYP1A est induite lors d'une exposition de l'organisme à des HAP. L'induction de CYP1A est rapide et les niveaux d'activité sont souvent augmentés par un facteur 100 quelques heures après l'exposition. (Schlenk et al. 2008)

Exemple des HAP alkylés

Les HAP alkylés ont été reconnus pour être dans certains cas beaucoup plus toxiques que leur homologue non alkylé (Turcotte et al. 2011). Bien que le mécanisme d'action de ces composés ne soit pas encore totalement élucidé, Fallahtafi et al. (2012) ont proposé différentes réactions d'hydroxylation de composés alkylés en particulier le 1-méthylphénanthrène chez les embryons et larves de médaka japonais. Les *para*-quinones, telles que les 1-méthyl-7-hydroxyphénanthrène et 1-méthyl-8-hydroxyphénanthrène (**Figure 7**), sembleraient être les métabolites les plus toxiques des quatre dérivés hydroxylés du 1-méthylphénanthrène étudiés. Les deux réactions d'hydroxylation présentées dans la figure ci-dessus seraient catalysées par l'enzyme CYP1A.

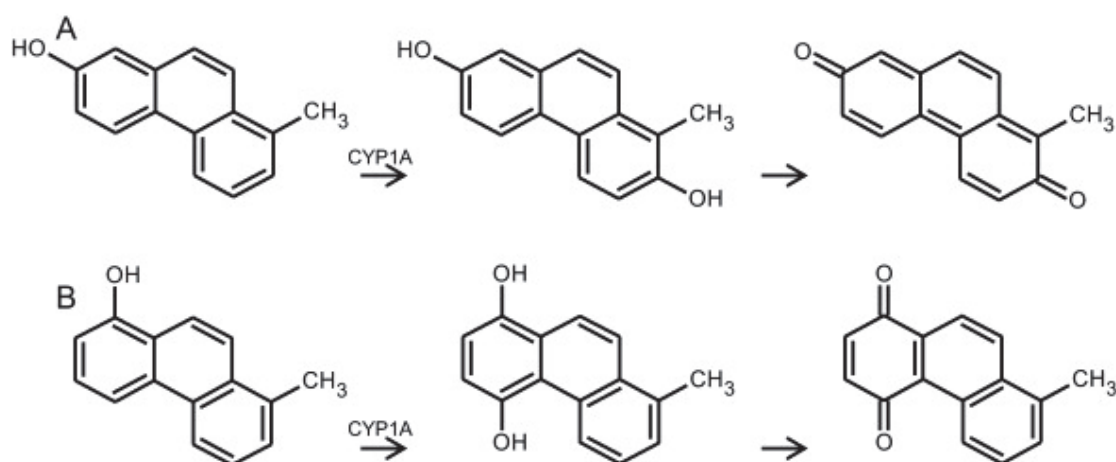


Figure 7. Hydroxylation de trois dérivés différents d'HAP alkylés. A – *para* hydroxylation du 1-méthyl-7-hydroxyphénanthrène. B- *para* hydroxylation du 1-méthyl-8-hydroxyphénanthrène.

2.2.4.2 Phase II de conjugaison

La phase II de conjugaison consiste à associer des groupements hydrophiles plus polaires aux métabolites oxydés issus de la phase I. Ces groupements hydrophiles sont de type acide aminé, acide glucuronique, acide sulfurique, glutathion. Les enzymes majoritaires impliquées dans ces réactions de conjugaison sont la glutathion S-transférase (GST) ; l'UDP glucuronyltransférase (UDPGT) ; la sulfotransférase (ST) (Kleinow et al. 1998 , Schlenk et al. 2008).

Dans le cas des HAP alkylés du phénanthrène, les métabolites époxydes sont bioactivés pendant la phase II par une réaction de conjugaison ajoutant un groupe sulfate à la molécule (Turcotte et al. 2011). Ces nouveaux métabolites formés réagissent avec des macromolécules électrophiles comme l'ADN.

Quelques jours après l'éclosion, le tube gastro-intestinal des larves de poissons s'ouvre. Les métabolites formés sont alors excrétés (Hornung et al. 2007).

2.3 Effets des HAP

La toxicité des HAP dépend majoritairement de leur structure chimique. Ainsi, Sundberg et al. (2005) ont souligné la variation de la toxicité de la fraction aromatique extrait d'un sédiment contaminé en HAP suivant son poids moléculaire sans relation dose-réponse évidente. Il semblerait que cette variation de toxicité suivant la structure de la molécule soit liée à la possible activation du récepteur cytosolique AhR (Tuvikene 1995). Le potentiel agoniste des HAP à activer ce récepteur varie suivant les molécules considérées.

2.3.1 Activation du récepteur Ah

Une fois qu'elles ont pénétré dans l'organisme les molécules de HAP agissent suivant différents mécanismes. Le plus étudié est la liaison de la molécule toxique au récepteur aryl hydrocarbure (AhR, *Aryl Hydrocarbon Receptor*). L'activation de l'AhR s'initie par sa liaison avec des xénobiotiques de forme comparable au TCDD tels que les HAP, PCB... (**Figure 8**). En se fixant sur ce récepteur les HAP peuvent traverser la membrane nucléaire. Une fois à l'intérieur du noyau le complexe se dissocie des molécules chaperonnes, et forme un hétérodimère avec l'ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Le complexe peut alors se lier aux promoteurs de différents gènes au niveau du motif de reconnaissance XRE (*Xenobiotic Response Element*) (aussi appelé DRE ou AHRE). Il en résulte la surexpression ou l'inhibition de nombreux gènes régulés par l'AhR provoquant des perturbations au niveau de l'intégrité de l'ADN, du système cardiaque, du système endocrinien, du développement embryonnaire-larvaire, du système nerveux central, et/ou du système immunitaire.

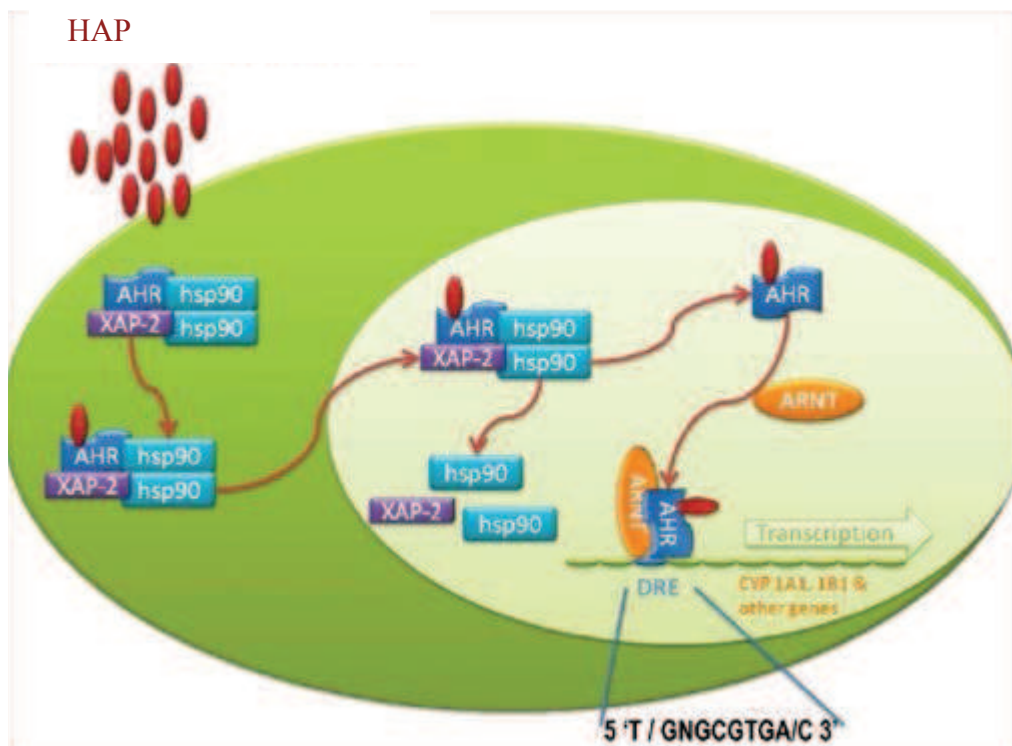


Figure 8. Activation de l'AhR par les HAP. XAP-2 et hsp90 représentent les molécules chaperonnes, et DRE le motif de reconnaissance. (Zhang 2011)

La structure chimique des HAP influe sur leur capacité à se lier au récepteur Ah. Les HAP de faibles poids moléculaires, comme le naphthalène, agissent indépendamment du AhR, tandis que les HAP de plus hauts poids moléculaires, comme le benzo[*a*]anthracène, sont de fort agonistes (Barron et al. 2004b, Incardona et al. 2004). De plus, l'alkylation d'un composé peut modifier son mécanisme d'action (Turcotte et al. 2011). Par exemple le phénanthrène est un faible agoniste de l'AhR (Billiard et al. 2002), tandis que son homologue alkylé, le rétène, est un agoniste de l'AhR2 (Scott et al. 2011).

Parmi les gènes régulés par l'AhR, les HAP peuvent moduler la transcription d'enzymes impliquées dans la métabolisation des contaminants tels que les CYP, ou la GST. L'induction de la protéine CYP 1A peut être étudiée par différentes méthodes. Par exemple, l'induction de l'activité éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) révèle l'activation de la protéine CYP1A (Whyte et al. 2000). Cette mesure d'activité EROD a été adaptée aux stades précoces de poissons embryons et larves. De nouvelles techniques sensibles et non invasives proposent des mesures spectro-fluorimétrique quantitative (Le Bihanic et al. 2013), et microscopiques semi-quantitative (Nacci et al. 1998). D'autre part, l'utilisation de molécules de synthèse bloquant l'expression d'un gène cible, appelées morpholinos, ont permis de mettre en évidence le rôle du gène *cyp1A*. Ainsi, (Incardona et al. 2004) ont démontré l'implication de l'AhR, par l'activation du *cyp1A*, dans la toxicité de HAP tétracycliques comme le chrysène et le pyrène.

Par ailleurs, de récentes études ont mis en évidence une toxicité de certains HAP alkylés indépendante du CYP1A mais dépendante de l'AhR. Le blocage du gène *cyp1A* chez des larves de poisson zèbre par des morpholinos, n'a pas diminué la toxicité du rétène tandis que le blocage du gène *ahr2* a empêché cette toxicité (Scott et al. 2011). De même la co-exposition de larves de truite au rétène et à un inhibiteur chimique de CYP1A (α -

naphthoflavone) a augmenté la tératogénicité du HAP, favorisant la formation de métabolites moins polaires (Hodson et al. 2007). Le mécanisme de toxicité du rétène pourrait impliquer d'autres isoformes de CYP que le CYP1A.

2.3.2 Mécanismes indépendant de l'activation du récepteur Ah

Les HAP peuvent provoquer des effets à travers différentes voies, certaines n'impliquant pas nécessairement la liaison à un récepteur spécifique. C'est le cas des HAP légers qui suivent un mécanisme de narcose (Di Toro et al. 2000, Incardona et al. 2004). Ce mécanisme implique le passage de xénobiotiques à travers les membranes biologiques qui perturbent leur fonctionnement (Sverdrup et al. 2002). Ce phénomène réversible aboutit à des altérations des fonctions de la membrane cellulaire et l'accumulation des HAP dans la bicouche lipidique. Il existe des modèles de prédictions des effets narcotiques suite à l'exposition aux HAP (Barron et al. 2004a, Di Toro et al. 2000).

D'après (Sverdrup et al. 2002) les HAP présentant un log Kow inférieur à 5,2 suivraient la voie de toxicité narcotique qui serait additive pour le cas de mélange de HAP légers. La toxicité des molécules impliquant le mécanisme narcotique augmente avec un caractère lipophile croissant. De plus, (Incardona et al. 2004) indiquent une toxicité vis-à-vis des larves de poisson zèbre plus importante du phénanthrène, composé tricyclique, que du naphthalène, composé plus hydrophile qui induit très peu d'effet tératogène. D'après leurs observations, les composés tricycliques comme le phénanthrène auraient un mode d'action indépendant de l'Ahr2, et ne sembleraient pas impliquer le mécanisme de narcose.

2.3.3 Tératogénicité

De nombreuses anomalies morphologiques ont été observées sur les embryons et larves de poissons après expositions aux HAP.

Le **syndrome du Blue sac disease BSD** correspond à une réponse physiologique de l'organisme similaire pour de nombreux polluants organiques dont font partie les HAP. Ce syndrome est caractérisé par la prévalence d'œdèmes péri-cardiaque et vitellin, la torsion de la colonne vertébrale (cyphose, lordose, scoliose), des anomalies cranio-faciales (absence ou atrophie de la mâchoire inférieure, anomalie de la taille ou de la pigmentation des yeux) et des altérations du développement du cœur (taille, position, orientation). Des méthodes de score sont utilisées afin d'évaluer la sévérité de ce syndrome après exposition des individus aux HAP (Rhodes et al. 2005, Scott &Hodson 2008).

Les études réalisées après le naufrage de l'*Exxon Valdez* ont mis en évidence des développements anormaux des SPD de poissons suite à leur contamination. L'exposition à ce mélange de HAP pétrogéniques a provoqué une diminution du temps de développement embryonnaire du hareng du pacifique (Carls et al. 1999). Les larves étaient alors physiologiquement immatures en comparaison aux témoins non exposés et présentaient de sévères malformations squelettiques, cranio-faciales, des nageoires, du système cardiovasculaire et du sac vitellin. Ces malformations ont été directement reliées à l'altération des capacités de nage et de prédation des larves, en particulier la déviation de la colonne vertébrale. Des observations identiques ont été réalisées après exposition de SPD de saumon rose, choquemort, et poisson zèbre incluant des œdèmes péri-cardiaques, des hémorragies, des malformations vertébrales ainsi que la réduction de la taille des larves exposées (Couillard 2002, Heintz et al. 1999, Hicken et al. 2011).

L'implication du CYP1A dans les mécanismes d'action produisant les effets tératogènes des HAP observés sur les SPD de poissons est discutée. D'après (Billiard et al. 2008), le syndrome du BSD pourrait s'expliquer par 4 mécanismes d'actions différents : la narcose, la cardiotoxicité, l'activation du récepteur AhR (en altérant la transcription de gènes) et la modulation de l'activité du *cyp1A*. Les auteurs soulignent l'implication du CYP1A dans la formation de métabolites toxiques, la formation d'ERO, et la toxicité du composé parent. Cependant certains HAP comme le BaP et le BkF sont de forts inducteurs de *cyp1A* mais n'induisent pas de toxicité de type BSD sur les SPD de poissons (Billiard et al. 2002, Wassenberg &Giulio 2004).

Les effets cardiotoxiques des HAP vis-à-vis des SPD de poissons sembleraient être à l'origine de plusieurs effets tératogènes notamment les malformations du squelette et oculaires (2005, Incardona et al. 2004, 2006). Ces effets varient selon les propriétés des molécules. Le développement du cœur chez les téléostéens commence par la formation d'un tube linéaire qui s'organise ensuite en boucle afin d'amener le ventricule à droite de l'atrium. Ce processus peut être altéré par l'exposition aux HAP au cours de la morphogénèse mais aussi une fois le système cardiaque mise en place. Trois modes de toxicité de HAP différents ont été observés : des effets indépendants de l'AhR sur le rythme cardiaque; des effets sur la morphogénèse cardiaque dépendants de l'AhR (Incardona et al. 2006, Scott et al. 2011) et une toxicité dépendante du CYP1A (Incardona et al. 2006).

La **Figure 9** illustre une toxicité des HAP non linéaire suivant le log de Kow. Les HAP de faibles poids moléculaires suivent le mécanisme de narcose pour lequel la toxicité du composé augmente avec sa lipophilicité (Incardona et al. 2004). Le plafond de toxicité est atteint pour les HAP tricycliques, suivant un mécanisme d'action qui semblerait indépendant du mécanisme de narcose et en majorité indépendant de l'AhR (Incardona et al. 2004). Puis,

pour les forts agonistes de l'Ahr, la toxicité diminue avec l'augmentation du log de Kow (Incardona et al. 2006). En effet la biodisponibilité des HAPs de hauts poids moléculaires semblerait limitée par leur solubilité. Par ailleurs, l'anthracène n'a pas été pris en compte dans cette représentation car malgré sa structure tricyclique aucun effet sur le développement des poissons zèbre n'a été observé (Incardona et al. 2004).

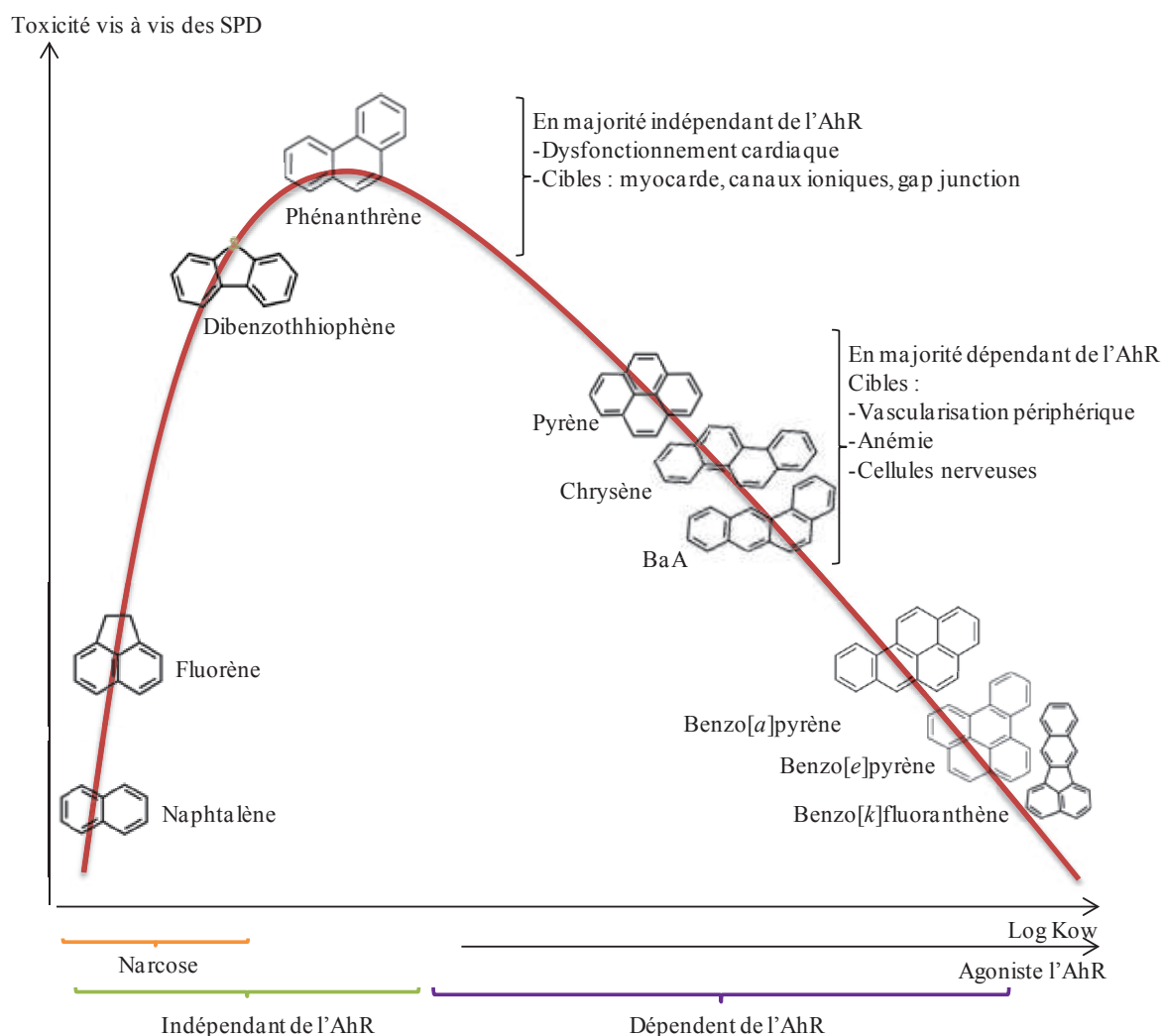


Figure 9. Toxicité de certains HAP suivant le log Kow. (Incardona et al. 2005, Incardona et al. 2004, Incardona et al. 2006, Incardona et al. 2011)

Incardona et al. (2004) ont montré que les **HAP dicycliques** aromatiques qui ne présentaient aucune affinité avec l'Ahr, comme le naphtalène, présentait très peu d'effet tératogènes. La relation entre la stimulation de l'activité EROD (marqueur de l'activité enzymatique des CYP) et les malformations observées chez les larves exposées à des HAPs légers n'était pas marquée.

Une autre exposition des larves de poissons zèbre à des **HAP tricycliques** comme le phénanthrène et le dibenzothiophène a fait apparaître des dysfonctionnements cardiaques, ce qui n'était pas le cas pour l'anthracène (Incardona et al. 2004). La concentration de ces deux composés tricycliques a été directement liée à la toxicité induite par des mélanges

complexes de HAP. Cela souligne le contrôle de la toxicité d'un mélange de HAP par ces composés tricycliques (Incardona et al. 2004).

En ce qui concerne les **HAP tétracycliques**, tel que le pyrène, le chrysène et le benzo[*a*]anthracène (BaA), une défaillance de la périphérie vasculaire, des anémies et la mort de cellules nerveuses ont été répertoriées chez les larves exposées. Cette cardiotoxicité des composés tétracycliques s'est révélée impliquer la voie de l'Ahr2 (Incardona et al. 2006).

La toxicité de certains HAP **pentacycliques** a également été mise en évidence. Le benzo[*a*]pyrène, benzo[*e*]pyrène, et benzo[*k*]fluoranthène sont tous les trois des inducteurs de la protéine CYP1A après liaison à l'Ahr. Cependant contrairement au benzo[*a*]pyrène, la toxicité du benzo[*k*]fluoranthène semblerait indépendante de l'activation de l'Ahr2 (Incardona et al. 2011).

2.3.4 Génotoxicité et cancérogénicité

2.3.4.1 Modification de l'intégrité des molécules d'ADN

L'ADN est une macromolécule biologique, support de l'hérédité, dont l'intégrité est indispensable à la survie des cellules. Suite à la bioactivation des HAP, des métabolites sont formés et sont capables de modifier l'intégrité de l'ADN soit de manière directe en se liant à l'ADN et en modifiant sa structure, soit indirectement en modifiant l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN ou en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) réagissant avec l'ADN. Différents marqueurs de génotoxicité sont couramment suivis chez les poissons adultes. On peut citer par exemple la formation d'adduits à l'ADN, les aberrations chromosomiques, l'apparition de mutants, de micronoyaux et d'échange de chromatide sœurs. Cependant les études portant sur les stades embryonnaires et larvaires sont rares.

Les adduits à l'ADN sont le résultat d'une attaque d'un composé électrophile sur une base de l'ADN. Une liaison covalente se forme alors. Les adduits formés par les HAP sont volumineux et peuvent conduire à une substitution de base et donc à des mutations. Par exemple les métabolites du benzo[*a*]pyrène (BaP), les BaP-diolépoxydes, sont des molécules très électrophiles qui se fixent à l'ADN et forment des adduits, mutation et cancers. Après exposition de larves de salmonidés à des sédiments naturels fortement contaminés en HAP, (Barbee et al. 2008) ont observé une induction significative des adduits à l'ADN chez les individus. Les cassures de brins d'ADN peuvent résulter d'une réparation incomplète des adduits. Ces cassures peuvent à la fois provoquer des effets aneugènes et clastogènes (Baršienė et al. 2006). Un effet aneugène se rapporte à une anomalie du nombre de chromosome aussi appelé aneuploïdie. Il résulte d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique. Lors de lésions clastogènes, une cassure apparaît dans le chromosome formant un chromosome séparé qui, après division cellulaire, sera maintenu dans le cytoplasme de l'une des deux cellules filles formant ainsi un micronoyau.

Les molécules électrophiles et les radicaux libres peuvent également attaquer la structure de l'ADN en provoquant des cassures simples et double brins (liées aux ruptures des liaisons phospho-diester entre les bases) ainsi que des sites alkali-labiles (intermédiaire dans le système de réparation par excision de base). Ces dommages sont détectables par le test des comètes. (Morin et al. 2011), (Kosmehl et al. 2006) et (Bony et al. 2008) ont mis en évidence l'induction de dommages à l'ADN par ce test sur SPD de médaka japonais, de poisson zèbre et de truite fario.

2.3.4.2 Systèmes de réparation

Les lésions à l'ADN sont réparées dans la plupart des cas. Les systèmes de réparation par excision de nucléotide NER (*Nucleotide Excision Repair*) et par excision de base BER (*Base Excision Repair*) sont les mécanismes les plus fréquemment mis en place pour la réparation des lésions à l'ADN chez les poissons (Kienzler et al. 2013). La lésion est tout d'abord reconnue par une enzyme endonucléase puis une ADN polymérase va exciser la chaîne carbonée comprenant plusieurs une seule base (BER) ou paires de bases (NER) ou qui sont endommagées. La polymérase recopie le brin complémentaire remplaçant ainsi les bases manquantes. Pour finir une ligase restaure les liaisons phosphodiester autour de la réparation. (Gagné et al. 2012) ont conduit une étude sur les hépatocytes de truite arc-en-ciel exposés à des eaux issus de procédés d'extraction de sables bitumineux et démontré que le gène de la ligase de l'ADN était surexprimé dans les cellules exposées. Il existe d'autres mécanismes de réparation comme la réparation directe ou par recombinaisons, moins fréquents (Kienzler et al. 2013).

2.3.4.3 La mutagénèse et cancérogénèse

On parle de génotoxicité lorsque l'on mesure les lésions primaires à l'ADN et de mutagénicité lorsque ces lésions conduisent à des mutations. Lors de l'exposition à un composé chimique exogène, le développement d'un cancer peut apparaître suite à la réalisation d'un ensemble de processus. On distingue 3 étapes dans le processus de cancérogénèse (Ostrander & Rotchell 2005):

- l'initiation : une mutation est acquise dans le génome d'une cellule normale
- la promotion : prolifération cellulaire, la cellule unique cancéreuse se propage pour former une tumeur multicellulaire
- la progression : évolution des lésions précancéreuses en tumeur maligne

Chez les SPD de poissons exposés aux HAP on observe régulièrement des tumeurs multicellulaire de types hyperplasies (augmentation du volume du tissu dû à une augmentation du nombre de cellules) et dysplasies (développement anormal du tissu) (Rodrigues et al. 2010). Les stades plus avancés du cancer ne s'observent pas chez les SPD de poissons car le processus est très lent à se mettre en place. Ainsi, (Cachot et al. 2007) ont exposés des embryons de médaka transgénique à des extraits de sédiment de la Seine fortement contaminés en HAP. Des mutations ont été observées sur ces poissons à des stades ultérieurs de 10 semaines et de 35 semaines.

2.3.4.4 Photomutagénicité

Les HAP peuvent être activés par voie biologique (2.2.4) mais également par des rayonnements UV. En mélange, la toxicité des HAP est stimulée en présence de radiation UV (Barron et al. 2003, Hatlen et al. 2010). Ce phénomène induit une production d'ERO dont l'oxygène radicalaire qui provoque des dommages rapidement observables sur les tissus. C'est le cas de la peroxydation des lipides des branchies (oxydation des lipides insaturés). L'exposition concomitante aux HAP et aux UV provoque des cassures de brin d'ADN, l'oxydation des bases de l'ADN et la formation d'adduits (IARC 2010).

2.3.4.5 Classement des HAP

IARC (*International Agency for Research on Cancer*) et le programme international sur la sécurité des substances chimique IPCS (*International Programme on Chemical Safety*) ont établi un classement des HAP cancérigènes et génotoxiques. Aucun classement de la photomutagénicité des HAP n'a encore été diffusé par les autorités bien que plusieurs études aient été publiées (**Tableau 9**).

Tableau 9. Génotoxicité et cancérogénicité des HAP d'après les classements de l'IPCS et de l'IARC.

Composés	Génotoxicité ¹	Cancérogénicité ¹ IPCS	Cancérogénicité ² IARC	Photo- mutagénicité ³
Naphtalène	-	(?)	2B (2002)	-
Acénaphène	(?)	?	3 (2010)	+
Acénaphthylène	(?)	nd	nd	+
Fluorène	-	-	3	+
Anthracène	-	-	3	++
Phénanthrène	(?)	(?)	3	-
Fluoranthène	+	(+)	3	-
Pyrène	(?)	(?)	3	++
Benzo[<i>a</i>]anthracène	+	+	2A	++
Chrysène	+	+	3	+
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	+	+	2B	-
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	+	+	2B	+
Benzo[<i>a</i>]pyrène	+	+	2A	++
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène	+	+	2A	-
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène	+	-	3	++
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène	+	+	2B	++

nd : non déterminé

¹Classement IPCS : + : effet positif ; - : effet négatif ; ? : Contestable ; () : Résultats dérivant d'un faible nombre de données. (IARC 2010)

²Classement IARC : 1 : cancérigène pour l'homme ; 2A : probablement cancérigène pour l'homme; 2B : possiblement cancérigène pour l'homme; 3 : pas classable par rapport à sa cancérogénicité ; 4 : probablement non cancérigène pour l'homme. (IPCS 1998)

³Classement de photomutagénicité : - non photomutagène ; + : photomutagène ; ++ photomutagène puissant (Yan et al. 2004)

Le **Tableau 9** révèle les HAP de haut poids moléculaire comme étant tous considérés génotoxiques, ce qui n'est pas le cas des composés de faible poids moléculaire à 3 cycles aromatiques ou moins. Les HAP alkylés et soufrés sont omis de ce classement.

2.3.5 Effets immunotoxiques

(Reynaud &Deschaux 2006) ont recensé différents effets, parfois même opposés, suivant la molécule de HAP, la voie d'administration, la concentration utilisée, le temps d'exposition ou encore l'espèce étudiée. L'immunotoxicité des HAP est dépendante de la liaison des HAP au récepteur Ah, impliquant les cytochromes P450, mais également de la mobilisation intracellulaire de calcium (Reynaud &Deschaux 2006). Par exemple le 3-méthylcholanthrène augmente significativement les niveaux de Ca²⁺ dans les phagocytes et lymphocytes de carpes *Cyprinus carpio*. Cette induction de la mobilisation de Ca²⁺ dépend de l'inhibition des ATPases du réticulum endoplasmique provoquée par ce HAP. Ces effets impliquent alors une

augmentation notable de la sensibilité aux agents pathogènes se traduisant par une altération des tissus des branchies, de la peau et des nageoires. Cependant le caractère immunotoxique des HAP est très peu documenté sur les embryons et larves de poissons.

2.3.6 Perturbation endocrinienne

En interférant avec la synthèse, le transport, la liaison aux récepteurs et le stockage des hormones naturelles, les HAP peuvent être considérés comme des perturbateurs endocriniens chez les poissons (IPCS 2002). En se liant à l'AhR les HAP peuvent perturber le système endocrinien des poissons. En effet le complexe HAP/AhR/ARNT peut se lier au XRE des promoteurs de gènes codant pour la synthèse d'hormone (Cheshenko et al. 2008). Une activité anti-œstrogénique des HAP, dépendante de l'AhR, a été rapportée chez des cellules de truite arc-en-ciel exposées à deux HAP le 3-méthylcholanthrène et l'anthracène (Navas & Segner 2000).

Peu d'études recensent des perturbations endocriniennes sur les SPD de poissons. Il n'en demeure pas moins que certains gènes codant pour la synthèse d'hormones sont déjà exprimés dès les premières heures de développement du système nerveux central. C'est le cas des gènes codant pour l'aromatase A (gonadique) et B (cérébrale) qui contrôlent la conversion de la testostérone en œstradiol (Callard et al. 2001).

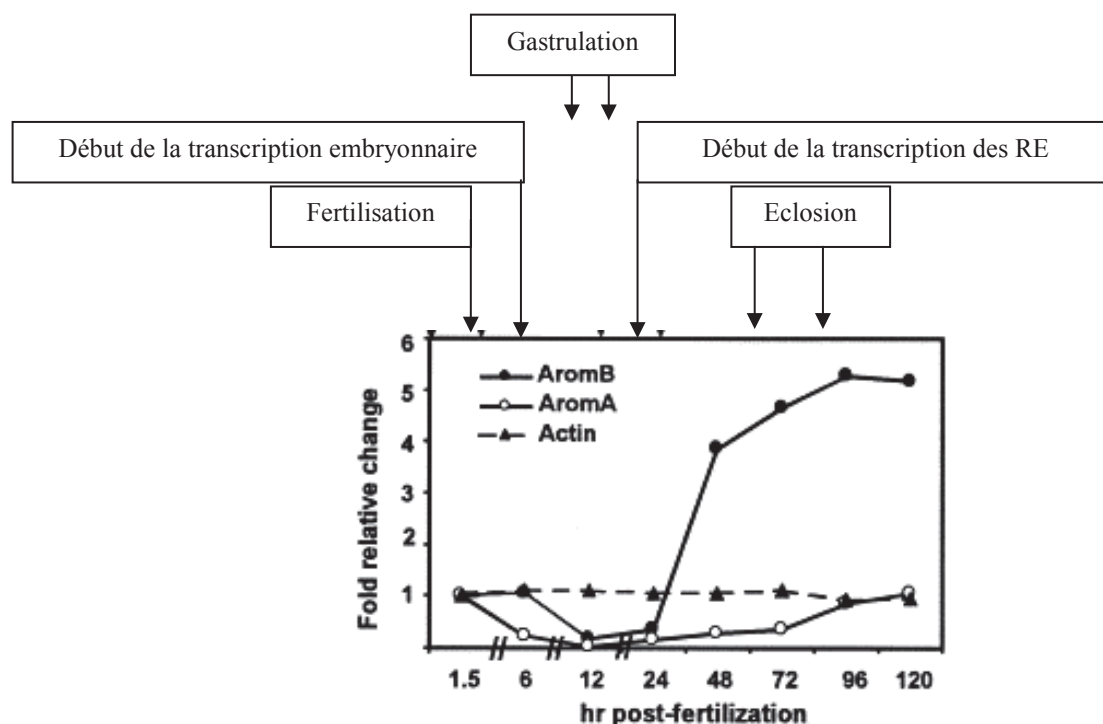


Figure 10. Expression des gènes codant pour la synthèse de l'aromatase A et l'aromatase B au cours du développement embryonnaire de poisson zèbre. Actin correspond au gène de référence. RE correspond à l'abréviation pour les récepteurs des œstrogènes. D'après (Callard et al. 2001).

La **Figure 10** met en évidence le transfert de l'ARNm maternel suivi de sa dégradation à la fin de la période de gastrulation. Puis le système nerveux central se met en place et l'ARNm de l'aromatase B s'exprime dans l'embryon dans les 24 h post fécondation. Des modulations d'expression de ces gènes impliqués dans la synthèse d'hormones pourraient conduire à des effets néfastes sur le développement des organismes chez des stades précoces de

développement et les performances biologiques notamment de reproduction chez des stades ultérieurs (Callard et al. 2001, Cowden et al. 2012, Tchoudakova et al. 2001).

2.3.7 Effets neurotoxiques

De nombreux polluants organiques persistants ont été reconnus neurotoxiques pour les poissons (Van der Oost et al. 2003). Cependant il existe peu de données concernant la neurotoxicité des HAP et les SPD de poissons.

Les teneurs en neurotransmetteurs tel que l'acétylcholine, la dopamine ou encore la sérotonine, sont les marqueurs de neurotoxicité classiquement étudiés chez les poissons (He et al. 2012, Van der Oost et al. 2003). Ces molécules endogènes sont directement impliquées dans la régulation de la physiologie des poissons notamment de l'activité locomotrice. Certains HAP ont été reconnus comme affectant la voie de ces neurotransmetteurs (Gesto et al. 2009). Il est envisageable que ces polluants modulent l'activité des individus exposés dont leur comportement.

C'est pourquoi des marqueurs intégrateurs des réponses neurotoxiques mais aussi du comportement global de l'organisme ont été proposés, à savoir les tests de locomotion sur larves de poissons (Cowden et al. 2012, Emran et al. 2007). En effet, le système de vision des poissons est un moyen utile pour étudier les processus cellulaires et moléculaires de développement des cellules neuronales et de synapse mais peut également témoigner de dysfonctionnements musculaires ou endocriniens pas nécessairement liés à la neurotoxicité. Des perturbations du système de vision peuvent provoquer des répercussions graves sur les larves de poissons tels qu'une altération du comportement pouvant impliquer des complications à des stades plus tardifs (Cowden et al. 2012). (Carvalho et al. 2008) ont rapporté des défaillances des capacités visuelles et de prédation des larves de dorades *Salminus brasiliensis* dès 0,01 mg.L⁻¹ de phénanthrène. (He et al. 2012) ont également observé des diminutions de l'innervation cranio-faciale à partir de 5 nmol.L⁻¹ de benzo[a]pyrène. Des travaux récents ont rapporté des comportements léthargiques et des nages anormales de poissons juvéniles exposés à plusieurs HAP de différentes structures (Gonçalves et al. 2008, Oliveira et al. 2012). La perturbation des performances de nage peut avoir de graves conséquences sur les stades de développement ultérieurs comme la défaillance de l'alimentation exogène (Couillard et al. 2011).

3 Modèles d'études

3.1 La truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*

3.1.1 Présentation du modèle

Oncorhynchus mykiss est un poisson originaire de la côte ouest de l'Amérique du Nord de la famille des salmonidés (**Figure 11 & Tableau 10**). L'aire de répartition naturelle de cette espèce s'étend de l'Alaska jusqu'au nord du Mexique (**Figure 12**). A la fin du XIX^{ème} siècle cette espèce a été introduite pour la pisciculture dans de nombreux pays en raison de sa croissance rapide et régulière. On la retrouve à présent en Europe, en Amérique du Sud, en Afrique et même dans l'océan indien. Cette espèce peut vivre dans différents types d'habitats tels que les lacs, les torrents, les rivières et les mers. (Jalabert &Fostier 2010)



Figure 11. Truite arc-en-ciel adulte (AGFC 2011).

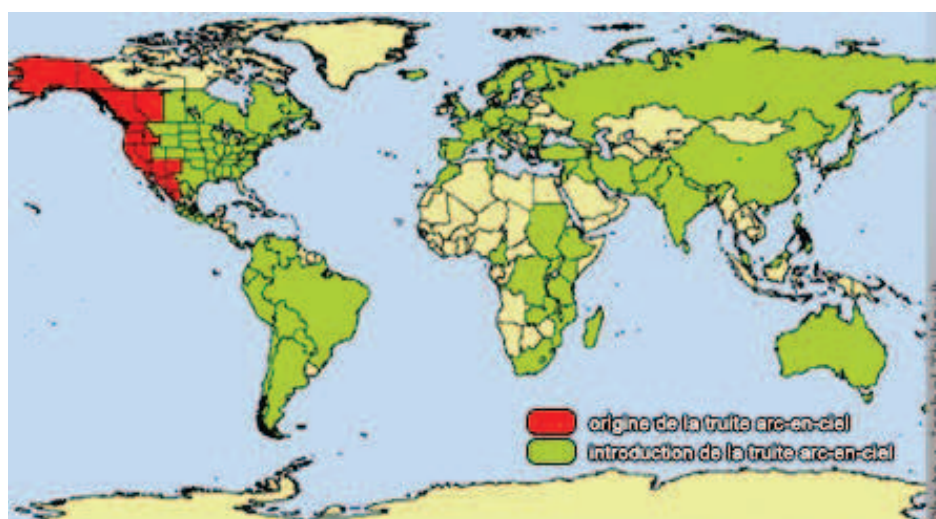


Figure 12. Aire de répartition de la truite arc-en-ciel naturelle (en rouge) et après son introduction (en vert) (Québec 2009).

Tableau 10. Classification de la truite arc-en-ciel (ITIS 2013).

Classe	Actinopterygii
Infra-classe	Teleostei
Superordre	Protacanthopterygii
Ordre	Salmoniformes
Famille	Salmonidae
Sous-famille	Salmonidae
Genre	<i>Oncorhynchus</i>
Espèce	<i>mykiss</i>

Dans des conditions naturelles, la fraie a lieu dans des eaux froides, très oxygénées, sur un lit de graviers. La femelle y creuse des dépressions pour y déposer les ovocytes. Le mâle féconde immédiatement les ovocytes dans le nid. La période de reproduction naturelle de la truite arc-en-ciel se déroule au printemps entre fin mars et début juillet. A l'aide des méthodes de zootechnie actuelles, il est possible de stimuler plusieurs périodes de ponte par an, par augmentation du régime alimentaire, de la température de l'eau etc.

3.1.2 Stades précoces de développement

Le développement embryonnaire présente des caractéristiques différentes suivant les espèces : taille de l'individu, surface du chorion, pigmentation, morphogénèse, etc. Le développement des œufs de truite arc-en-ciel se déroule en conditions naturelles à l'obscurité enfouis sous des graviers, dans une eau oxygénée, de 10 °C environ, et s'exprime habituellement en degré jour °J.

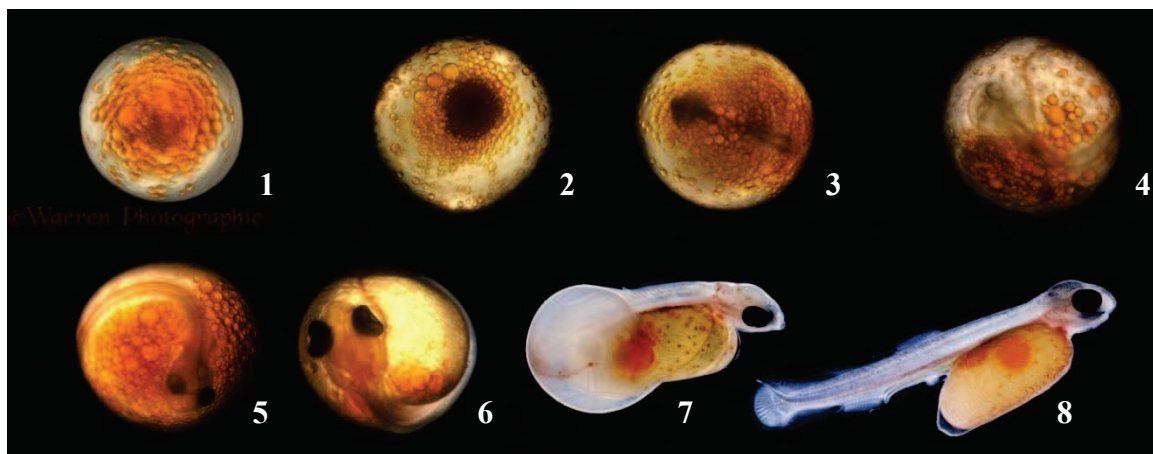


Figure 13. Développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel (Warren-Photographic 2013).

On peut distinguer 8 étapes majeures dans le développement des truites arc-en-ciel pour un développement dans de l'eau seulement (Vernier 1836):

Stade 1 (0 °J), l'ovocyte est fécondé et la différenciation bipolaire apparaît, débute alors la segmentation. En laboratoire, il est possible de réaliser la fécondation *in vitro*.

Stade 2 (20 °J env.), de nombreuses cellules sont visibles au pôle apical c'est le stade de morula.

Stade 3 (90 °J env.), fin de la gastrulation, les premiers somites sont visibles, le tube neural est formé et les vésicules optiques sont apparentes.

Stade 4 (150 °J env.), formation du bourgeon caudal, le bout de la queue commence à se détacher du sac vitellin, le cœur bat.

Stade 5 (180 °J env.), suite de la formation du bourgeon caudal, l'embryon mesure environ 7 mm de long. Ce stade est aussi appelé stade œillé car les yeux des embryons sont visibles, la choroïde (couche de la paroi du globe oculaire) est entièrement pigmentée. Jusqu'à ce stade il est très délicat de manipuler l'embryon car le blastoderme n'est pas entièrement refermé.

Stade 6 (280 °J env.), fin de la formation du bourgeon caudal, développement des nageoires dorsales et anales.

Stade 7 (280-350 °J env.), début des éclosions. Le processus d'éclosion intervient à la fin de l'organogénèse et peut durer plusieurs jours jusqu'à ce que la prolarve soit intégralement sortie du chorion. Un individu dont une partie du corps embryonnaire est à l'intérieur du chorion est appelé « demi-éclos »

Stade 8 (350 °J env.), la larve est éclosie et mesure de 14 à 16 mm de long, on commence à distinguer une ébauche de la deuxième nageoire dorsale, le sac vitellin est toujours présent, c'est le stade de larve vésiculée ou prolarve. Le tube gastro-intestinal est encore bouché, l'alimentation est endogène et se fait via le sac vitellin.

Le temps de développement est dépendant de la température et du substrat d'incubation. Pour une température de développement de 10 °C, la fin de la résorption du sac vitellin suivie du début de l'alimentation exogène et de la nage, survient environ 50 jours après fécondation (500 °J). Ce stade est appelé émergence. La différenciation sexuelle apparaît au cours des 3 premiers mois d'alimentation exogène. (Velsen 1987)

3.1.3 Intérêts écotoxicologiques du modèle

La truite arc-en-ciel présente l'avantage d'être facile d'élevage, commercialement disponible et d'avoir un faible taux de mortalité en conditions contrôlées. L'élevage et la reproduction de cette espèce sont entièrement maîtrisés. De plus le développement de cette espèce est bien documenté (Velsen 1987). L'utilisation de la truite comme animal modèle est préconisée par l'OCDE (OCDE 1992, 1998). Les jeunes stades de développement de la truite arc-en-ciel présentent une forte sensibilité aux HAP (Brinkworth et al. 2003, Hodson et al. 2007). Les salmonidés sont des espèces adaptés aux études *in situ* (Bony et al. 2008, Escartin & Porte 1999), en mésocosme (Brinkmann et al. 2013) mais aussi en laboratoire pour des expositions par voie dissoute (Billiard et al. 1999) et par contact à des graviers artificiellement contaminés en composés hydrophobes (Carls & Thedinga 2010, Heintz et al. 1999).

3.2 Le médaka japonais *Oryzias latipes*

3.2.1 Présentation du modèle

Oryzias latipes est un poisson d'eau douce originaire du Japon, de Taiwan et de l'Asie du Sud-est (**Figure 14**). Cette espèce est généralement retrouvée dans les rizières d'où son nom

commun de « ricefish ». Ce poisson appartient à la famille des Adrianichthyidae (**Tableau 11**). Le médaka japonais est très euryhalin et très eurytherme (Shima & Mitani 2004).

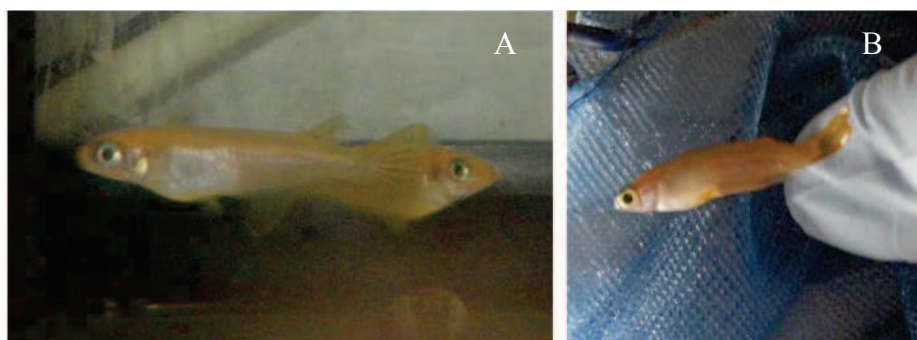


Figure 14. Médaka japonais. A – Couple d'adulte. B – Femelle adulte.

Tableau 11. Classification du médaka japonais (ITIS 2013).

Classe	Actinopterygii
Infra-classe	Teleostei
Super-ordre	Acanthopterygii
Ordre	Beloniformes
Famille	Adrianichthyidae
Sous-famille	Oryziinae
Genre	<i>Oryzias</i>
Espèces	<i>latipes</i>

La femelle pond jusqu'à une trentaine d'œufs qui restent accrochés sous son abdomen. Lors de la reproduction, le mâle se rapproche alors de la femelle et recouvre les ovocytes de ses propres gamètes. Après plusieurs minutes, les œufs se décrochent et se collent à des plantes aquatiques ou débris mixtes grâce aux villosités présentes sur la surface du chorion, et aux filaments reliant les œufs entre eux. La période de reproduction naturelle du médaka japonais s'étend d'avril à septembre. A l'aide des méthodes de zootechnie actuelles, il est possible de stimuler la ponte cette espèce continuellement tout au long de l'année par l'augmentation de la température, du régime alimentaire, et de la photopériode. (Iwamatsu 2004)

3.2.2 Stades précoces de développement

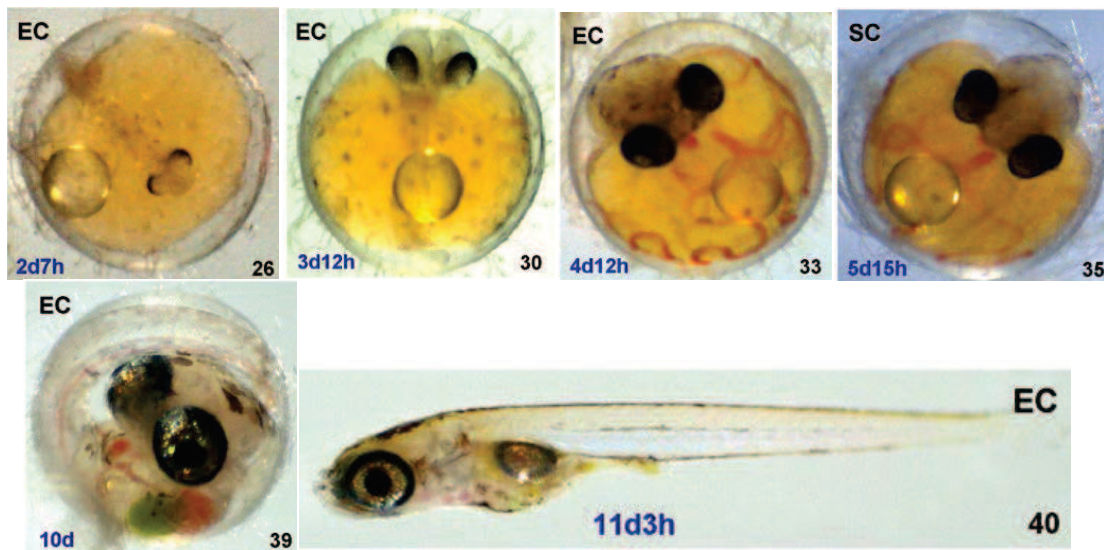


Figure 15. Développement embryonnaire de médaka japonais à 25 °C. Le temps et le stade de développement sont indiqués respectivement en bas à gauche et à droite de l'image (Orrego et al. 2011)

Les temps de développement sont approximatifs et dépendent de la température et du substrat d'incubation. L'unité de développement est le nombre de jour post fertilisation (jpf). On peut distinguer six étapes majeures du développement embryonnaire du médaka japonais (Iwamatsu 2004):

Stade 26 (2 jpf), on distingue environ 22 somites, la circulation sanguine est fonctionnelle, la veine caudale est apparente et le bout de la queue est déjà détaché du sac vitellin.

Stade 30 (3 jpf), on distingue 35 somites, les artères approvisionnant le sang pour les branchies et le cerveau sont visibles, on commence à distinguer la vessie natatoire.

Stade 33 (4 jpf), la notochorde est complète et l'on peut clairement voir le cristallin des deux globes oculaires.

Stade 35 (5 jpf), les vaisseaux sanguins viscéraux se forment, les guanophores sont distribués de la tête jusqu'au bout de la queue.

Stade 39 (10 jpf), début des éclosions, l'embryon mesure au total entre 3,8 et 4,2 mm de long. Il produit des chorionases qui vont dissoudre les couches internes du chorion. Puis, après des mouvements du corps, il déchire l'unique couche externe du chorion et s'en échappe la tête en premier.

Stade 40 (11 jpf), début du développement larvaire, au terme de la résorption du sac vitellin l'alimentation exogène débutera.

La maturité sexuelle des médaka japonais commence à apparaître dès l'âge de 2-3 mois (Shima & Mitani 2004).

3.2.3 Intérêts écotoxicologiques du modèle

L'espèce médaka japonais, *Oryzias latipes*, a été sélectionnée comme poisson modèle pour la sensibilité des jeunes stades de développement aux contaminants organiques (Barjhoux et al. 2012, Cachot et al. 2007, 2008, Farwell et al. 2006). Dès les premières heures de développement, le médaka est capable de bioaccumuler diverses classes de contaminants (Hornung et al. 2004, McElroy et al. 2006). De plus, cette espèce est facile à élever et le chorion des embryons est transparent ce qui permet de suivre leur développement pendant toute la durée de l'exposition. La biologie du développement de cette espèce est décrite avec précision dans la littérature (Iwamatsu 2004). L'élevage et la reproduction de cette espèce sont entièrement maîtrisés. De même le séquençage du génome est complet et les pathologies bien connues. La mortalité basale pendant le développement embryonnaire, les éclosions et le développement des larves est particulièrement bas, autour de 5 à 10 % (Barjhoux et al. 2012, Vicquelin et al. 2011). L'utilisation de cette espèce comme animal modèle est aussi préconisée par l'OCDE (OCDE 1992, 1998). Le test embryo-larvaire sur médaka, aussi appelé MELA, a été initialement développé pour l'évaluation de la toxicité de composés solubles dans l'eau (Helmstetter & Alden 1995). Enfin ce test a été adapté pour l'évaluation de la toxicité de composés hydrophobes enrobés sur des sédiments naturels (Cachot et al. 2007).

Le médaka japonais et la truite arc-en-ciel sont deux espèces complémentaires présentant des caractéristiques de développement différentes comparées dans le tableau ci-après. Le développement de ces espèces diffèrent en termes de durée, de taille des œufs et de réserves vitellines.

Tableau 12. Comparaison du développement embryo-larvaire du médaka japonais et de la truite arc-en-ciel en conditions contrôlées de laboratoire.

Développement embryo-larvaire	Médaka japonais	Truite arc-en-ciel
Durée de développement (approximative)	13j	45j
Salinité	5 PSU	0 PSU
Température	26 °C	10 °C
Photopériode	12:12	obscurité
Diamètre des œufs	1,5 mm	5 mm
Rapport surface vitellus / longueur larve à l'éclosion	0,1	1,3

4 Démarche scientifique

La démarche scientifique de ce projet s'est détaillée en deux volets comme illustré dans le schéma ci-dessous : d'une part le développement de bioessais et d'autre part l'étude comparée de mélange de HAP.

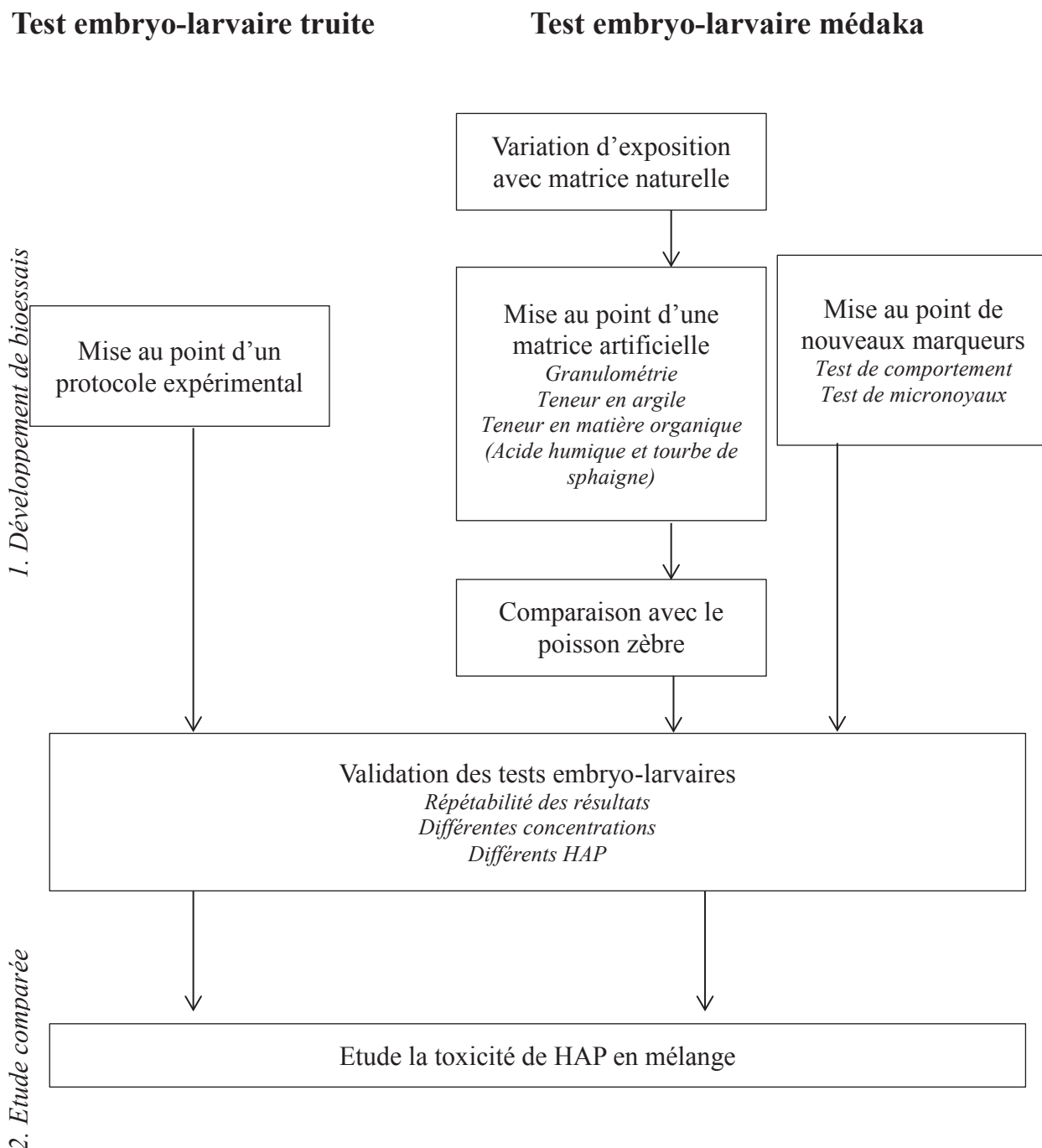


Figure 16. Démarche scientifique du projet de thèse.

Le développement de bioessais a consisté à mettre au point les tests embryo-larvaires truite et médaka japonais. Pour le test embryo-larvaire truite, un protocole expérimental adapté à l'évaluation de la toxicité de composés hydrophobes a été développé. Pour le test embryo-

larvaire médaka, l'utilisation de matrice naturelle d'exposition s'est avérée un facteur limitant la reproductibilité de l'exposition. De ce fait, une matrice d'exposition artificielle a été développée. Plusieurs expérimentations successives ont permis de déterminer la granulométrie, la teneur en argile et la teneur en matière organique adéquates au test. Les résultats obtenus ont été comparés à une autre espèce de poisson modèle le poisson zèbre *Danio rerio*. Parallèlement de nouveaux marqueurs de toxicité ont été mis au point : le test des micronoyaux sur larves entières et le test de locomotion. Les deux bioessais ont ensuite été validés en répétant les expositions pour différentes concentrations de HAP modèles et différentes molécules. Par la suite, ces tests ont été appliqués à une étude comparative de trois mélanges complexes de HAP.

CHAPITRE II

Développement de bioessais pour l'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes

Des tests embryo-larvaires poissons ont été mis au point sur deux espèces dans le but d'accroître la sensibilité de ces tests et d'élargir le panel d'indicateurs précoces de toxicité. Pour cela de nouvelles méthodes ont été développées avec la mise au point d'une matrice sédimentaire artificielle, d'un test de génotoxicité sur organisme entier et d'un test de locomotion.

1 Présentation des tests embryo-larvaires poissons

1.1 Le test embryo-larvaire truite

La station expérimentale PEIMA (INRA, Sizun, France) a fourni les gamètes de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* ainsi que les embryons au stade œillé à 180 °J provenant de plusieurs géniteurs différents.

1.1.1 Fécondation *in vitro*

La fécondation se déroule à $10 \pm 0,3$ °C à l'obscurité. Les ovules reçues dans du liquide cœlomique sont égouttés puis recouverts de 5 mL de sperme dilué dans un tampon de fécondation. Le mélange est homogénéisé pendant 5 min en remuant délicatement les gamètes. Après un ajout de 500 mL d'eau de source à 10 °C, les gamètes sont mis en contact 1 h le temps que la fécondation procède. Les œufs sont ensuite délicatement rincés trois fois à l'eau de source.

1.1.2 Exposition embryonnaire

Chaque condition est répliquée trois fois à l'identique. Pour chaque réplicat, 25 embryons nouvellement fécondés ou à 180 °J sont déposés dans des cristallisoirs de 100mL. Chacun de ces cristalloirs contenait 12 g p.s. de graviers de granulométrie 2-4 mm (Sibelco, France) ou de sédiment naturel et 50 mL d'eau de source (Saint Martin) aérée pendant 48 h. Les expériences se sont déroulées à l'obscurité à 10 ou $12 \pm 0,3$ °C. La concentration en oxygène dissous a été mesurée quotidiennement.

Tableau 13. Composition de l'eau de source Saint-Martin (24610, St Martin de Gurçon).

Analyse	mg.L ⁻¹
Calcium	68
Sodium	21
Magnésium	11
Potassium	2
Hydrogénocarbonates	216
Sulfates	39
Chlorures	28
Nitrates	<1
Extrait à sec à 180°C	300

Une condition témoin avec de l'eau de source uniquement a été ajoutée pour vérifier que ni le solvant ni les graviers n'avaient un effet sur le développement des embryons. Deux à trois jours avant le début des éclosions (environ 28 jours), l'incubation sur graviers est arrêtée et les embryons sont transférés dans de nouveaux cristallisoirs contenant 50 mL d'eau uniquement. Une fois écloses, les larves sont maintenues dans de nouveaux cristallisoirs contenant 50 mL d'eau de source et 20 mL de cette eau est renouvelée tous les 2 jours. Le test est arrêté à 400 °J. Tous les individus restants sont alors euthanasiés avec une dose létale de 120 mg L⁻¹ d'éthyl 4-aminobenzoate (benzocaïne, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

1.2 Le test embryo-larvaire médaka MELAc

Le Gis-Amagen (INRA, Gif-sur-Yvette, 78) a fourni les embryons de médaka japonais *Oryzias latipes* de la lignée CAB provenant de plusieurs couples en groupe. 1 jour après fécondation, les embryons sont déposés dans des paniers thermoformés en Nitex[®] à mailles de 1 mm, posés à la surface du sédiment. Les unités d'exposition, répliquées trois fois par condition, sont des boîtes de Petri en plastique (Greiner, Courtaboeuf, France) contenant du sédiment et du milieu ERS (Egg Rearing Solution : 1 g NaCl, 0,03 g KCl, 4,04 g CaCl₂ et 0,163 MgSO₄ dans 1 L d'eau Milli-Q autoclavée). La quantité d'ERS et de sédiment ainsi que le diamètre de boîte varient selon le nombre d'embryons et de larves nécessaires. L'expérience se déroule à 26±0,3 °C pour une photopériode jour : nuit de 12h : 12h, 5000 lx de lumière blanche. L'ERS est renouvelé quotidiennement. La concentration en oxygène dissous est mesurée tous les jours et le pH est vérifié le premier et le dernier jour d'exposition. Lorsque plus de la moitié des individus a éclos dans les trois réplicats d'une même condition, l'exposition est arrêtée. Les embryons non éclos sont transférés dans de nouvelles boîtes de Petri contenant uniquement de l'ERS jusqu'aux éclosions. Après avoir éclos, les pro-larves sont observées et transférées dans des béciers en verre contenant 20 mL d'eau de mélange (eau du robinet non filtrée mélangée à de l'eau distillée 1 : 2 v/v, aéré pendant 24 h). A la fin du test, 3 jours après le pic d'éclosion, la totalité des larves restantes est euthanasiée avec une dose létale de 120 mg L⁻¹ éthyl 4-aminobenzoate (benzocaïne, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Les pro-larves ne sont pas nourries pendant toute la durée du test. Les échantillons d'ERS prélevés sont conservés à -20 °C en attente des analyses chimiques.

1.2.1 Sédiment artificiel

La préparation du sédiment artificiel est détaillée dans l'article n°1. Brièvement, la tourbe blonde de sphaigne (Florentaise, St Mars du Désert, France) est séchée pendant 48h puis tamisée pour ne retenir que les particules en dessous de 0.5 mm. La tourbe est humidifiée avec de l'eau Milli-Q et agitée pendant 48 h à 180 rpm. Le sable et l'argile sont par la suite ajoutés à la tourbe. Le sédiment est alors agité en continu à 180 rpm pendant 24 h. Le pH est ensuite ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de calcite (10 % dans de l'eau Milli-Q). Après 7 jours de stabilisation à température ambiante, 1 : 4 v/v d'eau Milli-Q est ajouté. Puis l'eau surnageante est enlevée après 24 h de décantation. Le sédiment est ensuite séché à 105 °C pendant 14 h sans agitation.

1.3 Analyses chimiques et enrobage

1.3.1 Extraction de la fraction aromatique

La fraction aromatique d'un échantillon de sédiment et de deux pétroles a été extraite afin d'en évaluer la toxicité. Tout d'abord, la fraction aromatique d'un sédiment de la Seine fortement contaminé en HAP a été extraite par micro-ondes puis concentrée dans de l'isooctane (HPLC grade, Scharlau, Barcelone, Espagne) à l'aide d'un Système d'évaporation sous vide (Rapidvap, Labconco, Kansas, Etats-Unis). Ensuite cet extrait, ainsi que les deux coupes pétrolières, ont été purifiées sur colonne d'alumine et éluées avec 3 x 5 mL de dichlorométhane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgique). Après une nouvelle étape de re-concentration sous flux d'azote, les fractions aliphatiques ont été éluées sur colonne de silice à l'aide d'un mélange pentane/dichlorométhane (65 : 35 v/v). Atlantic Labo (Bruges, France) a fourni le solvant pentane. Pour finir, les échantillons ont été re-concentrés dans de l'isooctane.

1.3.2 Enrobage

Pour chaque expérience la matrice sédimentaire ou de gravier de la condition témoin est d'abord enrobée avec le solvant dichlorométhane uniquement (Valkenswaard, the Netherlands). Puis les matrices des conditions contaminées sont enrobées avec les composés considérés dans le dichlorométhane. Suivant la quantité de matrice sédimentaire nécessaire, un ballon en verre de 250 mL ou 1 L est utilisé. Deux volumes de dichlorométhane y sont ajoutés pour un volume de matrice, soit par exemple 30 mL de dichlorométhane pour 15 g de sédiment à enrober. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavapor (IKA, Staufen, Allemagne) à 45°C, 115 rpm, pendant 1 à 2 h 30. Pour s'assurer de l'élimination des solvants résiduels, la matrice enrobée est laissée 24 h à l'obscurité à température ambiante sous la hotte dans des barquettes en aluminium. Pour chaque matrice enrobée, 5 g sont stockés à -20 °C pour la réalisation des analyses chimiques post-enrobage.

1.3.3 Analyse chimique des HAP

L'analyse chimique des matrices sédimentaires nécessite 0,2 g p.s.. Pour les matrices graviers, 1g p.s. est utilisé pour tenir compte de la variabilité de contaminants adsorbés entre chaque gravier. L'analyse des tissus biologiques nécessite 10 mg p.s. de matrice, soit environ 40-50 individus. L'analyse chimique des matrices humides lors du prélèvement requiert une étape de lyophilisation avant l'étape d'extraction des composés. Le tableau ci-après détaille les composés deutérés correspondants à chacun des composés natifs à doser ajoutés à la matrice et à un blanc d'analyse avant extraction.

Tableau 14. Dosage des composés HAP .

Composés à doser	HAP deutérés pour les matrices sédiment, gravier et tissus	HAP deutérés pour les dosages dans la colonne d'eau
Naphtalène	Naphtalène d8	Naphtalène d8
Acénaphtylène	Phénanthrène d10	Acénaphtylène d8
Acénaphène	Phénanthrène d10	Acénaphène d10
Fluorène	Phénanthrène d10	Fluorène d10
Dibenzo[<i>bd</i>]thiophène	Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène d8	Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène d8
Phénanthrène	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
Anthracène	Anthracène d10	Anthracène d10
Fluoranthène	Fluoranthène d10	Fluoranthène d10
Pyrène	Fluoranthène d10	Pyrène d10
Benzo[<i>a</i>]anthracène	Chrysène d12	Benzo[<i>a</i>]anthracène d12
Triphénylène + Chrysène ^a	Chrysène d12	Chrysène d12
Benzo[<i>b</i>]naphto[2,1- <i>d</i>]thiophène	Chrysène d12	Chrysène d12
Benzo[<i>b+k+j</i>]fluoranthène ^a	Benzo[<i>e</i>]pyrène d12	Benzo[<i>b</i>]fluoranthène d12
Benzo[<i>e</i>]pyrène	Benzo[<i>e</i>]pyrène d12	Benzo[<i>e</i>]pyrène d12
Benzo[<i>a</i>]pyrène	Benzo[<i>a</i>]pyrène d12	Benzo[<i>a</i>]pyrène d12
Pérylène	Benzo[<i>e</i>]pyrène d12	Pérylène d12
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène	Benzo[<i>ghi</i>]pérylène d12	Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène d12
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène + Dibenzo[<i>ac</i>]anthracène ^a	Benzo[<i>ghi</i>]pérylène d12	Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène d14
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène	Benzo[<i>ghi</i>]pérylène d12	Benzo[<i>ghi</i>]pérylène d12
2-méthylnaphtalène	Naphtalène d8	Naphtalène d8
1-méthylnaphtalène	Naphtalène d8	Naphtalène d8
3-méthylphénanthrène	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
2-méthylphénanthrène	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
2-méthylanthracène	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
9-méthylphénanthrène + 2-méthylanthracène ^a	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
1-méthylphénanthrène	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
4-méthyldibenzothiophène	Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène d8	Dibenzo[<i>bd</i>]thiophène d8
3+2-méthyldibenzothiophène ^a	Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène d8	Dibenzo[<i>bd</i>]thiophène d8
1-méthyldibenzothiophène	Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène d8	Dibenzo[<i>bd</i>]thiophène d8
Diméthylnaphtalènes ^a	Naphtalène d8	Naphtalène d8
Triméthylnaphtalènes ^a	Naphtalène d8	Naphtalène d8
Tetraméthylnaphtalènes ^a	Naphtalène d8	Naphtalène d8
Diméthylphénanthrènes ^a	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
Triméthylphénanthrènes ^a	Phénanthrène d10	Phénanthrène d10
Méthylchrysènes ^a	Chrysène d12	Chrysène d12

^aco-éluant

Les composés HAP sont extraits pendant 10 min à 30 W par extraction micro-ondes avec le dichlorométhane pour solvant (Budzinski et al. 2000). Les échantillons sont re-concentrés à l'aide d'un système d'évaporation sous vide Rotavapor puis purifiés sur des micro-colonnes d'alumine et élués avec 3 x 5 mL de dichlorométhane. Après une nouvelle étape de re-

concentration sous flux d'azote, la fraction aliphatique est éluée sur micro-colonnes de silice avec un mélange de solvant pentane/dichlorométhane (65/35, v/v). Pour finir, les échantillons sont re-concentrés dans de l'isooctane puis les étalons pyrène d10 et benzo[b]fluoranthène d12 sont tous les deux ajoutés avant injection. Les composés HAP sont analysés par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS), comme décrit par Baumard et al. (1999). Ce protocole a été appliqué et validé avec le sédiment marin certifié SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

Pour l'analyse des HAP dans la colonne d'eau, les étalons internes sont ajoutés à 1,4 mL d'échantillon d'eau. Puisque la méthode utilisée ne nécessite pas d'extraction, une seule solution d'étalon est utilisée. Un composé étalon est ajouté pour chaque HAP dosé. Les étalons internes utilisés sont détaillés dans le **Tableau 14**.

1.4 Critères de toxicité

1.4.1 Effets létaux et développement

La survie des embryons et des larves est suivie quotidiennement tout au long de leur développement. Les embryons morts sont retirés de l'unité d'exposition au fur et à mesure afin de ne pas altérer le milieu. Le pourcentage de mortalité embryonnaire correspond au nombre d'individus morts par rapport au nombre d'embryon initial. Le taux d'éclosion correspond au nombre d'individus éclos par rapport au nombre d'individus initial. Le temps de demi-éclosion correspond au temps pour lequel 50 % des larves d'une condition ont éclos. Il est calculé par régression linéaire du taux d'éclosion en fonction des jours de développement. Les régressions linéaires avec un $R^2 < 0,85$ ont été exclues des calculs. Le développement des truites et leur processus d'éclosion étant plus long que ceux du médaka, la mortalité des individus demi-éclos a également été calculée pour cette espèce. Un individu est considéré demi-éclos lorsqu'une partie seulement du corps embryonnaire est à l'extérieur du chorion.

1.4.2 Rythme cardiaque

Le rythme cardiaque des embryons de médaka est mesuré au jour 7 post fécondation. Les embryons sont temporairement transférés dans du milieu ERS pour faciliter la mesure. Les battements cardiaques de 5 embryons par réplicat sont comptés manuellement pendant 3 périodes de 20 sec à l'aide d'un stéréo-microscope MZ 7.5 Leica (Nanterre, France) au grossissement X25. Ces valeurs sont sommées pour obtenir une valeur de battements par minute pour chaque embryon. La mesure est réalisée après 5 min d'incubation à la température de la pièce climatisée à 23 ± 1 °C.

1.4.3 Biométrie

La taille de la tête des larves (du point terminal de la tête de la mâchoire inférieure jusqu'à l'arrière des opercules), la longueur totale des larves (du point terminal de la tête de la mâchoire inférieure jusqu'au bout de la nageoire caudale) et l'aire du sac vitellin des larves (en excluant les zones de la vessie natatoire et de la cavité cardiaque) sont mesurées entre 0 et 24 h après éclosion à partir de photographies (**Figure 17**). Pour les mesures de sac vitellin, les

photographies de larves sur le dos ou le ventre sont exclues, uniquement les photos de larves sur la tranche ont été conservées. Le gonflement ou non de la vessie natatoire à l'éclosion a également été rapporté. Ces mesures sont effectuées à l'aide d'une loupe binoculaire MZ7.5 Leica, d'une caméra CCD DFP420C Leica et du logiciel Leica Microsystems v3.8 (Nanterre, France).



Figure 17. Mesures d'une larve de médaka japonais à l'éclosion.

1.4.4 Malformations

Entre 0 et 24 h après éclosion, 15 larves sont observées à la loupe binoculaire MZ7.5 Leica afin de repérer d'éventuelles malformations morphologiques.

La larve de truite arc-en-ciel est disposée dans une boîte de Petri contenant un gel d'agarose à 1,5 % (LB Agar) et 2 mL d'eau. Elle est ainsi immobilisée pour être prise en photo et mesurée. Six types de malformations sont recherchés : œdème (vitellin, péri-cardiaque ou cranio-facial), malformations squelettique (scoliose, lordose, déformation de la queue), cranio-faciale (malformation de la mâchoire, absence d'œil, hypertrophie ou atrophie de l'œil), fonctionnement du cœur (position du cœur, taille du ventricule, arythmie), anomalie vasculaire (anémie ou hémorragie) et vitelline (chorion lié au sac vitellin à l'éclosion) (**Figure 18**).

La larve de médaka japonais est anesthésiée dans de l'eau gazeuse avant d'être disposée dans une boîte de Petri contenant une goutte d'eau de mélange. Elle est ainsi immobilisée pour être prise en photo et mesurée. Plusieurs types de malformations sont recherchés : œdème (vitellins, péri-cardiaques ou cranio-facial), malformations squelettique (scoliose, lordose, déformation de la queue), cranio-faciale (malformation de la mâchoire, absence d'œil, hypertrophie ou atrophie de l'œil) et cardiaque (position du cœur, taille du ventricule, arythmie, anémie ou hémorragie) (**Figure 19**). Les malformations sont comptabilisées sur un principe de score *i.e.* 1 point par type de malformation. Une larve peut présenter plusieurs types de malformations et /ou plusieurs malformations du même type.

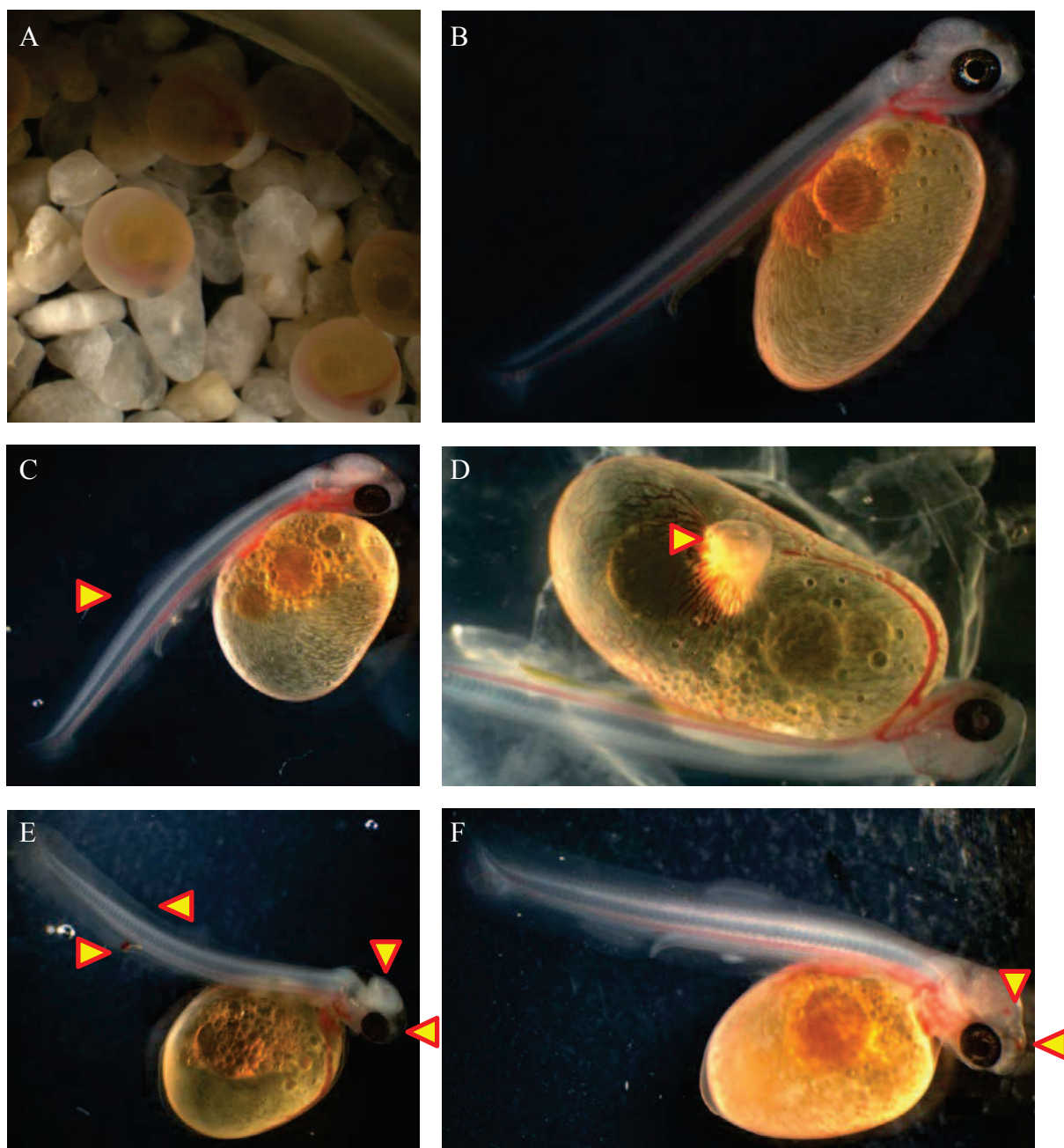


Figure 18. Test embryo-larvaire sur truite arc-en-ciel. A - Développement des embryons sur graviers (270 °J) ; B – Larve témoin sans anomalie visible ; C - Lordose ; D – Malabsorption du sac vitellin ; E – Lordose, hémorragies ; F : Hémorragies.

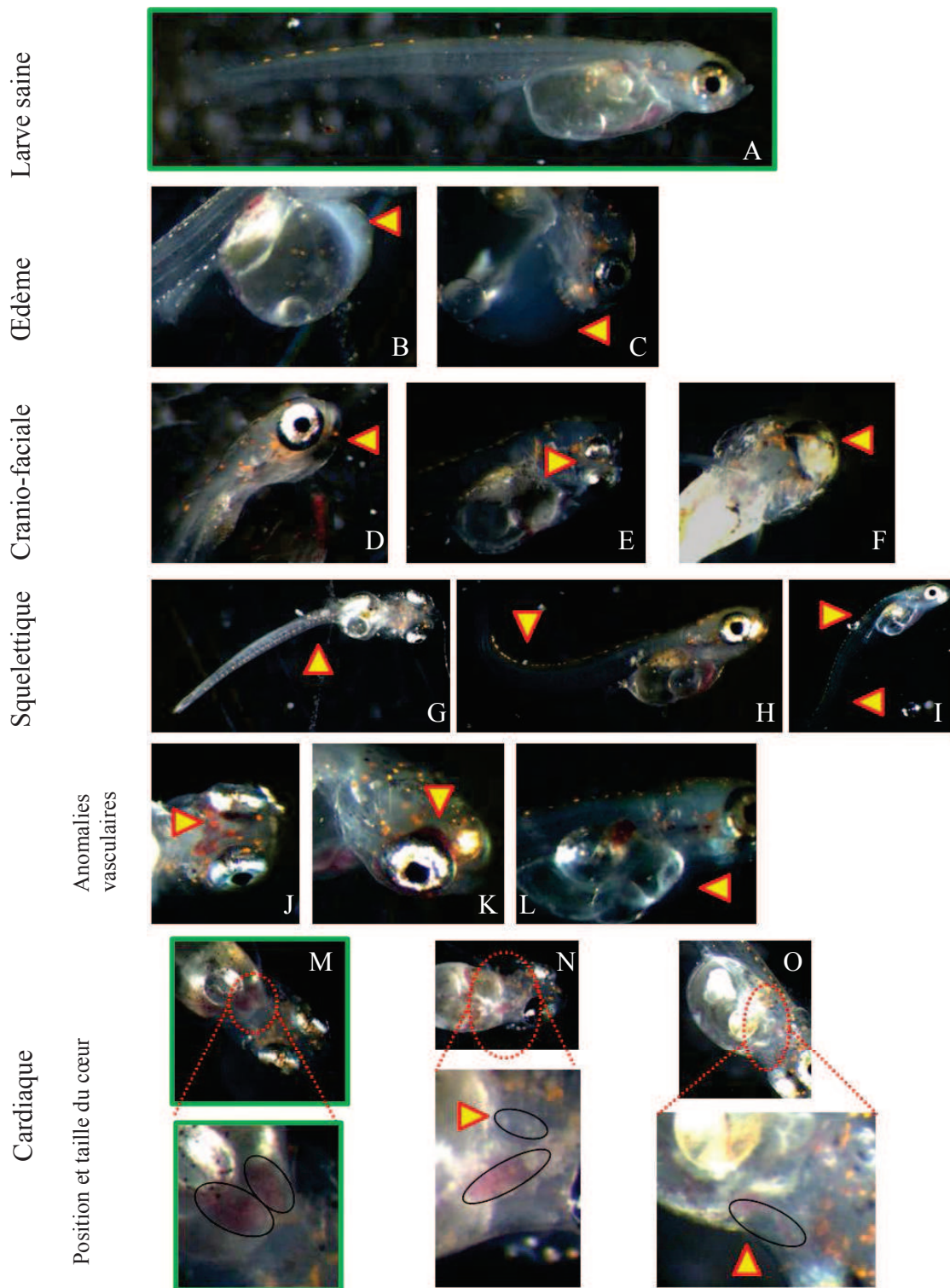


Figure 19. Test embryo-larvaire sur médaka japonais. A - Larve à l'éclosion témoin ne portant aucun signe de malformation. B et C - Œdèmes péri-cardiaques, coloration bleue illustrant le syndrome du BSD. D - Malformation de la mâchoire inférieure. E - Déformation de la mâchoire : 3 globes oculaires. F - Cyclopie : 1 globe oculaire unique. G - Scoliose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan frontal. H - Lordose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan médian. I - Cyphose : hyper convexité du squelette ; et lordose. J - Hémorragie située sur la mâchoire inférieure. K - Hémorragie sur le contour de l'œil. L - Anémie : très faible coloration du sang. M - Position et taille des chambres cardiaques d'un

individu témoin. N - Malformation de la taille d'un ventricule : Ventricule droit atrophié. O – Anomalie de la taille et de la position du ventricule.

1.4.5 Test de locomotion

La locomotion des larves de médaka est analysée à 14 jpf à partir de 13 h. Cela permet de limiter les importantes variations d'activité des larves le matin dues à leur cycle biologique. Les larves sont sélectionnées aléatoirement et réparties sur 5 microplaques de 48 puits. Après avoir été acclimatées à l'obscurité et dans la microplaque, les larves sont soumises à un cycle alternant des périodes de lumière et d'obscurité. Les coordonnées des larves sont alors enregistrées avec une caméra digitale infrarouge (Ikegami Electronics, Neuss, Allemagne). La **Figure 20** illustre un exemple d'analyse de données ainsi que la chambre d'analyse Daniovision (Noldus, Wageningen, les Pays-Bas). Ces mesures sont réalisées à 23 ± 1 °C à l'aide du logiciel Ethovision 9.0 (Noldus, Wageningen, Pays-Bas). La méthode de soustraction dynamique est appliquée avec un taux d'échantillonnage de 25 images par sec, un contraste sombre 16-225, la taille du sujet 2-12500 et aucun élargissement du contour du sujet. La vitesse, la distance parcourue et la mobilité de chacune des larves ont été calculées. Afin de s'acquitter du bruit de fond, les données ont été filtrées en utilisant comme seuil pour la détection du mouvement, une distance minimale parcourue de 0,4 mm correspondant à 10 % de la taille totale moyenne d'une larve. La mobilité correspond à la période pendant laquelle la totalité de l'aire représentant l'animal est modifiée même si le point central reste le même. Le seuil d'immobilité a été fixé à 20 % et le seuil d'hyper-mobilité à 60 %. Toutes les microplaques sont analysées avec des paramètres identiques de température, de détection et d'acquisition. Les larves présentant des malformations de la colonne vertébrale ou des œdèmes ne sont pas considérées pour l'analyse comportementale. La mise au point du protocole de mesure de l'activité natatoire est détaillée dans l'article n° 3.

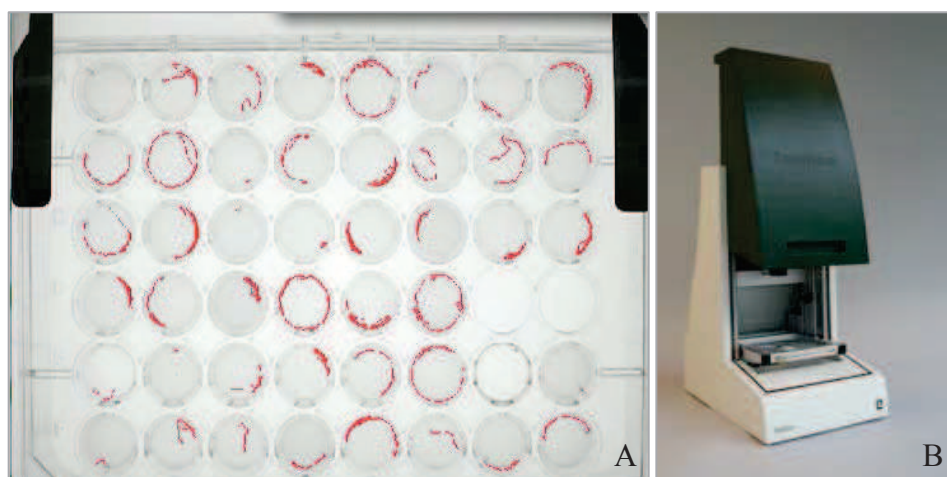


Figure 20. Analyse de l'activité natatoire des larves de médaka japonais. A – Trajectoire des larves tracées dans chacun des puits d'une microplaque 48 puits par le logiciel Ethovision; B – Chambre d'analyse Daniovision, Noldus®

1.4.6 Marqueurs d'intégrité génétique

Deux tests de génotoxicité sont réalisés : le test des comètes qui permet de mettre en évidence les dommages à l'ADN réversibles et le test de micronoyaux pour la détection des dommages à l'ADN irréversibles. Les tests sont réalisés soit à partir de tissus de larves entières pour le médaka japonais, soit à partir de prélèvements sanguins pour la truite arc-en-ciel. Contrairement aux érythrocytes, les tests sur tissus biologiques nécessitent une étape préalable de dissociation cellulaire. Les cellules utilisées pour le test des comètes et celui des micronoyaux proviennent des mêmes suspensions cellulaires de tissus ou d'érythrocytes.

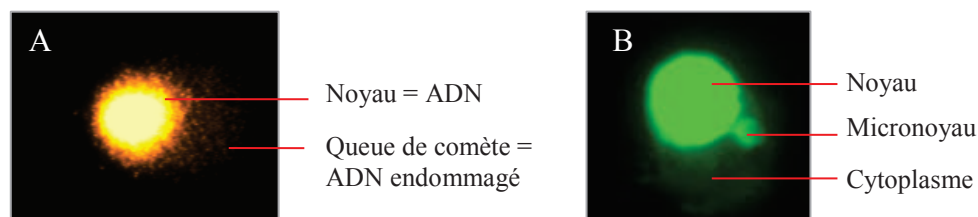


Figure 21. Tests de génotoxicité. A - Test des comètes : cellule de médaka japonais dont l'ADN endommagé a migré pour former une queue de comète. B – Test des micronoyaux : cellule de médaka japonais micronuclée.

1.4.6.1 Dissociation cellulaire de larves entières de médaka japonais

Le protocole de dissociation cellulaire de larves entières de médaka japonais a été décrit par Morin et al. (2011). Les larves de médaka sont anesthésiées à 2-3 jours après éclosion puis cisailées avec des lames de rasoirs dégraissées. Les échantillons subissent ensuite une dissociation enzymatique par la dispase II de *Bacillus polymyxa* (Roche, Meylan, France) 1 g.mL^{-1} dans une solution de MEM (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) à 37°C pendant 45 min, et sous agitation à 150 rpm. Après une centrifugation à $1\,000 \text{ g}$ pendant 10 min à température ambiante, le culot est remis en suspension dans $200 \mu\text{L}$ de MEM. La viabilité et la concentration cellulaire des échantillons sont évaluées après coloration au bleu de Trypan sur cellules de Malassez.

1.4.6.2 Prélèvement sanguin de larves de truite arc-en-ciel

Le sang de larves à 350°J est échantillonné par une ponction cardiaque à l'aide de pointes héparinées et immédiatement mélangé dans 1 mL de MEM. Les échantillons sont conservés sur la glace pendant le temps du prélèvement. Une ponction représente environ $10 \mu\text{L}$.

1.4.6.3 Le test des comètes

Le test des comètes est réalisé suivant le protocole de Singh et al. (1988). $50 \mu\text{L}$ de suspension cellulaire sont ajoutés à $100 \mu\text{L}$ d'agarose à faible point de fusion LMPA (1 %, p/p) et deux gels de $50 \mu\text{L}$ sont étalés sur des lames préalablement recouvertes d'agarose à point de fusion normal (NMPA, 1%, p/p). Des lamelles $18 \times 18 \text{ mm}$ sont ensuite déposées sur les gels. Les gels sont alors durcis 5 min à 4°C pour pouvoir délicatement retirer les lamelles.

Une nouvelle couche de LMPA est ajoutée sur chacun des gels et de nouveau recouvert d'une lamelle. Après durcissement pendant 5 min à 4 °C, les lamelles sont définitivement retirées et les lames sont placées dans une solution de lyse fraîchement préparée pendant 1 h à l'abri de la lumière (2,5 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,01 M Tris; pH ajusté à 10 avec NaOH). Un pourcent de Triton X-100 est ajouté extemporanément à la solution. Les lames sont alors placées à l'horizontal dans une cuve d'électrophorèse et couvertes d'un tampon d'électrophorèse fraîchement préparé (0,3 M NaOH; 1 mM EDTA; pH > 13) pendant 10 min pour permettre à l'ADN de se dérouler. L'électrophorèse s'opère à 25 V, 300 mA pendant 10 min. Les lames sont rincées trois fois dans une solution de neutralisation (0,4 M Tris; pH = 7,5) pendant 5 min à 4 °C. Pour finir, les lames sont déshydratées dans de l'éthanol absolu glacé pendant 20 min et séchées à température ambiante. Avant la lecture, les lames sont colorées avec du bromure d'éthidium (20 µg.mL⁻¹) de façon à colorer spécifiquement l'ADN. La lecture des lames s'effectue au grossissement 400X à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence (Olympus, Rungis, France), d'un filtre d'excitation de 515-560 nm et d'un filtre de barrière d'émission à 590 nm, avec une caméra CCD en niveau de gris (Zeiss, Germany). Les dommages à l'ADN sont mesurés sur 100 cellules de chacun des échantillons à l'aide du logiciel Komet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, UK) ou du logiciel Comet assay IV software (Perceptive instruments, Bury St Edmunds, UK), et sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (**Figure 21**). Le pourcentage de cellules gravement endommagées appelées cellules « hedgehog » correspond à des cellules apoptotiques ou nécrotiques (Olive & Banáth 1995). Il est lui aussi déterminé sur 100 cellules.

1.4.6.4 Le test des micronoyaux

Le reste de la suspension cellulaire est centrifugé à 1 000 g pendant 10 min à température ambiante afin de récupérer les culots et de les fixer avec 100 µL de fixateur de Carnoy (acide acétique : méthanol, 1 :4). Après 10 minutes de fixation, les suspensions cellulaires sont étalées sous forme de frottis sur des lames en verre puis laissées 24 h sous la hotte pour que le solvant s'évapore. Juste avant la lecture, les lames sont colorées avec 40 µL d'acridine orange (0,003 % dans du PBS) et recouvertes d'une lamelle. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Mille cellules choisies aléatoirement sont observées pour chaque échantillon au grossissement 400X. Le dénombrement des micronoyaux est réalisé par un lecteur unique. Un micronoyau doit être rond, non-accolé au noyau principal, de taille comprise entre 1/3 et 1/16 du noyau principal et de coloration verte identique à celle du noyau principal, comme illustré par la **Figure 21** (Hayashi et al. 1998). Les cellules dont le cytoplasme se chevauche, non dissociées, multi-nucléées ou de coloration orange-rouge ne sont pas comptabilisées.

La validation du protocole du test des micronoyaux sur larves entières de médaka japonais est détaillée dans l'article n° 3.

1.4.7 Marqueurs d'expression génique

1.4.7.1 Extraction et rétro-transcription de l'ARN

Les médakas sont prélevés respectivement au jour 6 pour le stade embryonnaire et au moment des éclosions pour le stade larvaire dans un tampon de conservation (RNA later, Qiagen). Les échantillons sont ensuite directement transférés dans de l'azote liquide et stockés

à -80 °C dans l'attente des analyses. Trois groupes d'individus sont prélevés par réplicat. Les embryons et larves sont homogénéisés suivant deux méthodes différentes. Les tissus des larves sont broyés avec des microbilles en céramique (Lysing matrix D bulk, MP biomedical, Santa Ana, USA) à l'aide d'un homogénéisateur FastPrep®-24 (40s MP biomedical, Santa Ana, USA), 4 mouvements par sec à température ambiante, alors que les tissus des embryons sont broyés manuellement à l'aide de mini-potter. Les ARN totaux de ces échantillons sont extraits à l'aide du kit Mini-prep Absolutely RNA RT-PCR (Stratagene, Agilent, Etats-Unis) d'après les instructions du fabricant. La qualité des ARN produits est évaluée par électrophorèse sur un gel d'agarose-formaldéhyde 1 % et leur concentration est déterminée par spectrophotométrie.

Le kit Affinity Script Multiple Temperature cDNA synthesis (Stratagene, Agilent, Etats-Unis) a été utilisé pour la réaction de reverse transcription des ARN. Les ADNc obtenus en fin de réaction sont conservés à -20 °C jusqu'à réalisation de la réaction de PCR en temps réel.

1.4.7.2 Design des amorces

Les numéros d'accès des 17 gènes utilisés sont documentés dans le tableau ci-après. Pour chaque gène deux amorces spécifiques sens (5'→3') et anti-sens (3'→5') ont été déterminées à l'aide du logiciel LightCycler probe design v1.0 (Roche, Meylan, France). Une partie des amorces avait été dessinée précédemment par (Barjhoux 2011).

Tableau 15. Amorces PCR et numéros d'accès des gènes étudiés.

Fonction	Gene	Numéro d'accès	Amorces (5'- 3')
Gènes de référence	<i>β-actin</i>	S74868	GTGACCCACACAGTGCC ^a GCGACGTAGCACAGCTTC ^b
Gènes de référence	<i>rpl7</i>	NM_001104870	AACGTGGCTACGGCAG ^a CGAGGTGACGACAGCTT ^b
Biotransformation	<i>cyp1a</i>	AY297923	CTCCCTTTCACAATTCCACACT ^a TGCAACGCCGCTTTCC ^b
Développement	<i>Wnt1</i>	AJ243208	CCGCTTTGACGGAGCAT ^a TTGAACCCACGCCCACAGC ^b
Cytosquelette	<i>β-catenin</i>	XM_004077778	CCAACCTGACCTGCAACA ^a GCGACGGCGGATGAAGTA ^b
Apoptose/ Réparation de l'ADN/ Développement	<i>p53</i>	AF212997	TCTGGCACTGCAAAGTCTGT ^a CCTCGTTTTGGTGGTGGG ^b
Apoptose	<i>bax</i>	ENSORLG000000004 56	TCTTCGCTCAGTCCCTCC ^a GCCAACGTCTGCCAGCCA ^b
Apoptose	<i>caspase 3</i>	AB032608	TTGTCTTGTAAGGACACCGC ^a GCGATCAGGAGCAGGTGAA ^b
Défense anti-oxydante	<i>sod Mt</i>	ENSORLG000000132 61	ATGGCTGGGCTATGACAAAG ^a TGGCTATCTGAAGACGCTCAC ^b
Défense anti-oxydante	<i>sod(Cu)</i>	ENSORLG000000080 41	GGGAAATGTGACCGCAGG ^a GCCAAACGCGCTCCAG ^b
Rétinol	<i>rara1</i>	EF546452	GCATCATCAAGACGGTGGAG ^a GGCGAAAGCGAAAACCAGG ^b
Métabolisme hormonal	<i>cyp19b</i>	AY319970	CATTCTCAACATTGGTCTCATGC ^a CGGGGACACACCGTGTA ^b
Réparation de l'ADN	<i>gadd45</i>	AB211172	GGAAGTGAACGGGGACTATTCT ^a CGTCCTTCACGTCGTCCTC ^b
Réparation de l'ADN	<i>oggl</i>	ENSORLG000000107 58	CTCGTATTACGGGCATGGT ^a ACCCGTGGCTGTCTAAG ^b
Réparation de l'ADN	<i>rad 23</i>	ENSORLG000000056 24	CAGCAGACCTTCAAAAATCGACA ^a ACCATGACGACCACAAAGT ^b
Chaine respiratoire mitochondriale	<i>coxI</i>	NC_004387	TTCCCCAACACTTCTTAGGC ^a TGTGGCTGTTAGTTCGACTGA ^b
Quantité d'ADN mitochondrial	<i>12s</i>	AF257248	AGCCATTTCTTCCCCTCTCA ^a AGGGTACTACGAGCACCAG ^b

^a Amorce sens ; ^b Amorce anti-sens

La spécificité et la qualité des amplifications des gènes sélectionnés ont été préalablement vérifiées. 1 µL de bromure d'éthidium 10 mg. L⁻¹ est ajouté à un gel d'agarose NMPA (1 %, v/v) préparé dans 50 mL de tampon (40 mM de Tris-Base, 20 mM d'acide acétique, 2 mM de Na₂EDTA :2 H₂O). Le gel est déposé dans une cuve d'électrophorèse et 5 µL d'amplicon mélangés à 5 µL de bleu de charge sont déposés dans les puits du gel d'agarose. 5 µL de marqueur de taille (Kb DNA ladder, Agilent) sont déposés sur le gel pour mesurer la taille des fragments. La migration électrophorétique est réalisée à 100 V pendant 30 min. Les fragments sont ensuite observés sur table UV (GelDoc, BioRad). Les amorces sont validées si les

amplicons obtenus ne montrent qu'une bande après migration sur gel d'électrophorèse (**Figure 22**) et si le pic de fusion obtenu après réaction est unimodal.



Figure 22. Migration des amplicons sur gel d'électrophorèse. A : marqueurs de taille, B : amplicon de *12s*, C : amplicon de *caspase 3*, D : amplicon de *β -catenin*, E : amplicon de *cyp19b*, F : amplicon de *gadd45*.

1.4.7.3 PCR en temps réel

Les réactions en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) sont réalisées avec le thermocycleur Stratagene Mx3000P à l'aide des kits de réactifs Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) en suivant les instructions du fabricant. Dans chaque puits de la microplaque 10 μ L de tampon 2X (Promega, Fitchburg, USA), 7 μ L d'eau DEPC, 2 μ L de mélange d'amorces sens et anti-sens (1 :1, v/v, 2 μ M chacune) et 1 μ L d'ADNc sont ajoutés. La réaction de PCR en temps réel consiste en une première étape d'activation de 10 min à 95 °C puis 40 cycles d'amplification de 30 s à 95 °C, puis 40 s à 60 °C et 30 s à 72 °C. Les courbes d'amplification et de fusion de chaque échantillon sont vérifiées en fin de réaction à l'aide du logiciel McPro QPCR Software (Stratagene, Agilent, USA), puis la valeur du seuil d'amplification C_t en est extraite. L'expression génique d'un échantillon correspond à $2^{-\Delta C_t}$ avec ΔC_t correspondant à la différence entre le C_t du gène étudié et le C_t moyenné des deux gènes de référence *β -actine* et *rpl7*. Le facteur d'induction d'un gène correspond au rapport de l'expression génique moyenne du traitement considéré avec l'expression génique moyenne dans les témoins.

1.5 Analyses statistiques

Chacune des conditions a été répliquée trois fois à l'identique. Chaque réplicat est considéré comme un échantillon indépendant et la condition solvant représente la condition témoin. Les données sont représentées par des moyennes \pm l'écart-type. Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour évaluer la relation entre les paramètres étudiés. Dans le cas de données platykurtiques, les valeurs ont été transformées avec l'arc-sinus de la racine carré avant les analyses statistiques. Dans le cas de données suivant une distribution contagieuse, les valeurs ont subi une transformation logarithmique (Legendre & Legendre 1998). La normalité de la distribution des données a d'abord été vérifiée sur les résidus des données par le test de Shapiro-Wilk ($p < 0,01$). L'homogénéité des variances a ensuite été évaluée par le test de Levène ($p < 0,05$). Dans le cas de variances homogènes et de normalité des données, une analyse Anova a été effectuée sur les données suivie d'un test post-hoc de Tukey. Dans le

cas contraire, les données ont été analysées par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Les analyses en composantes principales sont réalisées sur les paramètres exprimant une différence significative par rapport à la condition témoin et sont représentées sur les 2 axes principaux par le logiciel R (<http://cran.r-project.org/>).

2 Mise au point des tests embryo-larvaires

2.1 Mise au point du test embryo-larvaire truite

Introduction

Un nouveau protocole expérimental a été développé afin de mettre au point un test embryo-larvaire truite. Dans un premier temps la pertinence de l'utilisation de sédiments bruts naturels pour le test embryo-larvaire truite a été évaluée (**expérience A**). Dans un second temps les meilleures conditions de développement embryonnaire en laboratoire en termes de substrat d'incubation, de période d'incubation et de renouvellement d'eau ont été examinées (**expérience B**).

Matériel et méthodes

Au cours de ces deux expériences, les individus n'ont été exposés à aucun contaminant.

Dans le cas de l'**expérience A**, des embryons de truite arc-en-ciel au stade œillé ont été exposés à quatre sédiments de l'estuaire de la Seine afin de caractériser leur toxicité et de sélectionner un substrat de référence. L'INRA-PEIMA (Sizun, 29) a fourni des embryons de truite arc-en-ciel au stade 180 °J. 35 embryons ont été déposés sur 10 g p.s. de sédiment dans 50 mL d'eau de mélange à 10 °C (eau de mélange : eau du robinet/ eau osmosée 1 :3 v/v). Les sédiments naturels ont été prélevés en aval de Paris au niveau des communes de Poses, Duclair, Yville-sur-Seine et au pied du Pont de Normandie. Yville-sur-Seine (76, France) est une gravière soumise à de faibles pressions anthropiques et est un site considéré dépourvu de contamination chimique. Le sédiment qui y a été prélevé en 2008 puis en 2010 est considéré comme sédiment témoin de référence (Cachot et al. 2006). Il s'est avéré indemne de toxicité vis-à-vis des embryons de médaka japonais (Vicquelin et al. 2011). Les sédiments de Seine testés dans cette expérience ont présenté une granulométrie relativement fine et une concentration variable en argile et en matière organique.

L'**expérience B** consistait à déterminer les périodes d'exposition et de renouvellement d'eau adéquates au test embryo-larvaire truite. Les embryons ont été incubés sur un substrat artificiel, i.e. des graviers fournis par la carrière Sibelco (Mios, 33) et lavés à l'HCl 1% (v/v). Pour cela trois méthodes différentes de renouvellement d'eau ont été testées pour trois stades de développement différents ; soit au total neuf conditions différentes de développement (**Figure 23** et **Tableau 16**). Les ovocytes et spermatozoïdes ont été fournis par l'INRA-PEIMA (Sizun, 29). La fécondation a été réalisée à l'obscurité à 12 °C. 1 h après fécondation les embryons ont été déposés dans des cristallisoirs en verre contenant de l'eau de source Saint Martin mise à buller 48 h à l'avance. Chaque condition a été réalisée en 4 réplicats contenant chacun 25 œufs à 0 °J : 3 réplicats de suivi de survie et 1 réplicat destiné uniquement à la mesure d'oxygène. Le suivi de la mesure d'oxygène n'ayant pas modifié le développement du quatrième réplicat, il n'a donc pas été présenté dans les résultats.

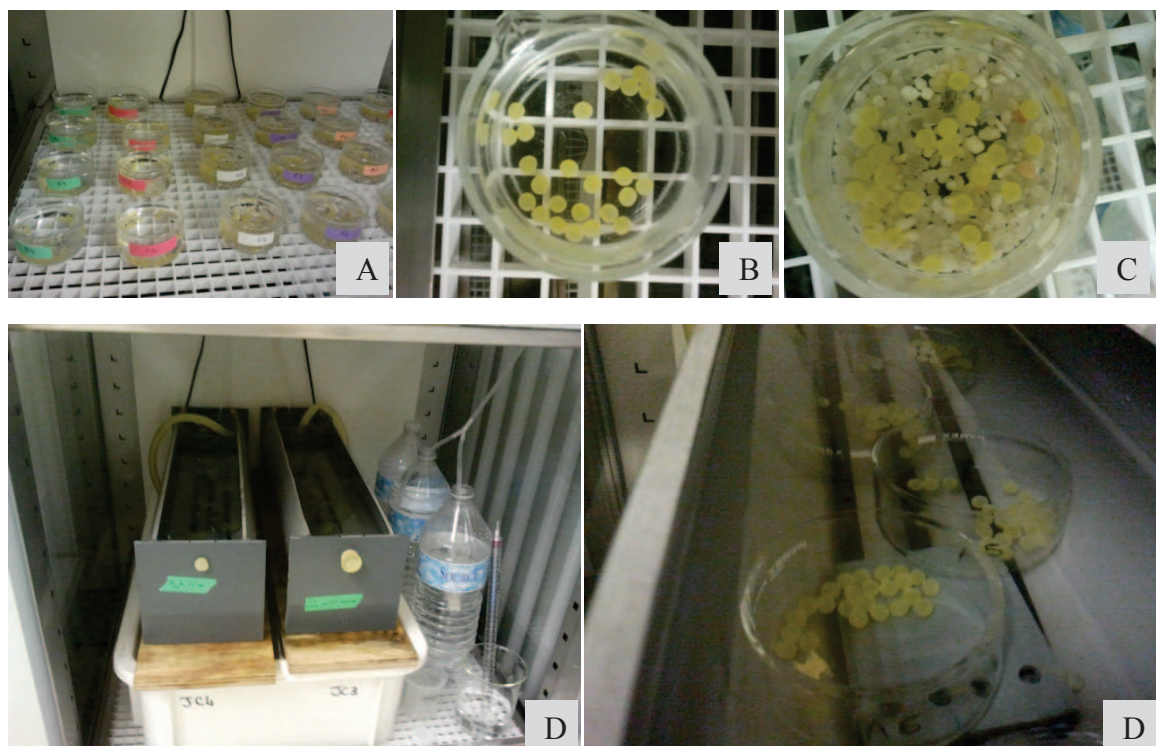


Figure 23. A - Développement embryonnaire en condition *statique* et *semi-statique*. B - Développement embryonnaire en eau de source uniquement. C - Développement embryonnaire sur graviers. D et E - Développement embryonnaire en condition *dynamique* (canaux).

- *Statique* : chaque cristallisoir contenait 50 mL d'eau de source Saint martin. L'eau n'a pas été renouvelée pendant l'exposition. La condition statique de développement a été réalisée à la fois sur graviers et dans de l'eau de source uniquement.

- *Semi-statique* : chaque cristallisoir contenait 50 mL d'eau de source. 25 mL d'eau a été renouvelée tous les 2-3 jours. La condition semi-statique de développement a été réalisée à la fois sur graviers et dans de l'eau de source uniquement.

- *Dynamique* : les cristallisoirs ont été déposés dans des canaux contenant chacun 10 L d'eau de source Saint Martin sans graviers en circuit fermé avec un débit d'environ 20 L/h.

Tableau 16. Protocole expérimental de l'expérience B.

Condition	0°J Fécondation	180°J Stade œillé	252°J Eclotions
<i>Dynamique 0</i>	Canaux	Canaux	Canaux
<i>Semi-statique 0</i>	Eau	Eau	Canaux
<i>Statique 0</i>	Eau	Eau	Canaux
<i>Semi-statique 1</i>	Graviers	Canaux	Canaux
<i>Statique 1</i>	Graviers	Canaux	Canaux
<i>Semi-statique 2</i>	Canaux	Graviers	Canaux
<i>Statique 2</i>	Canaux	Graviers	Canaux
<i>Semi-statique 1+2</i>	Graviers	Graviers	Canaux
<i>Statique 1+2</i>	Graviers	Graviers	Canaux

Les individus des conditions *dynamique 0*, *semi-statique 0*, *statique 0* n'ont eu aucun contact avec les graviers pendant leur développement embryonnaire. Les individus des conditions *semi-statique 1* et *statique 1* ont été mis au contact de graviers non contaminés de la fécondation jusqu'au stade œillé. Les individus des conditions *semi-statique 2* et *statique 2* ont été mis en contact avec les graviers du stade œillé jusqu'à l'éclosion. Les individus des conditions *semi-statique 1+2* et *statique 1+2* ont été mis au contact avec les graviers tout au long de leur développement embryonnaire. Deux jours avant le début des éclosions (252 °J) la totalité des embryons a été transférée en condition *dynamique 0* dans des boîtes de Petri en verre (diam. = 35 mm).

Résultats

EXPERIENCE A

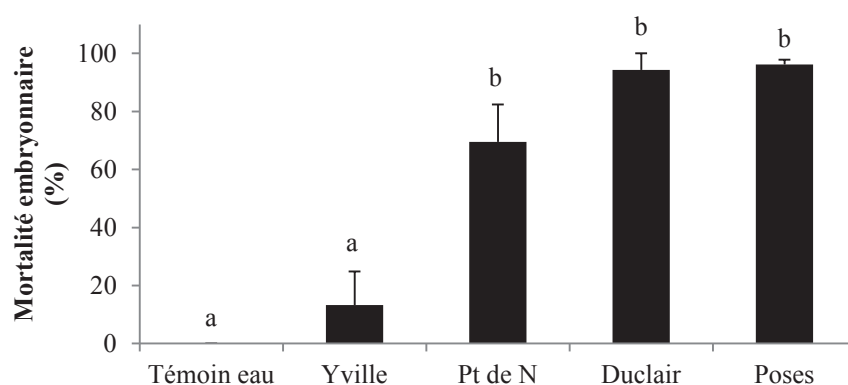


Figure 24. Mortalité embryonnaire après 3 jours d'exposition (de 190 à 220°J). L'abréviation Pt de N fait référence au site de prélèvement Pont de Normandie. (N = 3)

L'incubation des embryons a induit très rapidement une importante mortalité pour les sédiments de Pt de N, Duclair et Poses. Après 3 jours d'exposition $13 \pm 11,5$ % d'embryons incubés sur le sédiment d'Yville sont morts, comparé à 0 ± 0 % pour le témoin eau. L'incubation des embryons sur les sédiments de Pt de N, Poses et de Duclair a provoqué 70 ± 13 %, 96 ± 2 % et 94 ± 6 % d'embryons morts respectivement.

EXPERIENCE B

Au cours de la première période de développement embryonnaire la concentration en oxygène dans l'eau avoisinait 100 % dans les canaux *eau dynamique* (données non présentées). A partir de 100 °J, soit 9 jours d'expérience, la concentration en oxygène dissous a diminué dans les conditions *semi-statiques* et *statiques* mais est restée supérieure à 80 %.

Tableau 17. Effet du renouvellement de l'eau et du substrat d'incubation sur le développement embryo-larvaire des truites arc-en-ciel. Les flèches représentent une valeur significativement plus élevée (↑) que les individus témoins développés en condition dynamique.

	Survie	Taux d'éclosion	Biométrie	Durée de développement	Individus malformés	Poids des individus
Eau <i>dynamique</i> (témoin)						
Eau <i>semi-statique 1+2</i>				↑		
Eau <i>statique 1+2</i>				↑		
Graviers <i>semi-statique 1</i>				↑		
Graviers <i>statique 1</i>			↑	↑		
Graviers <i>semi-statique 1</i>				↑		
Graviers <i>statique 2</i>				↑		
Graviers <i>semi-statique 2</i>				↑		
Graviers <i>statique 1+2</i>				↑		
Graviers <i>semi-statique 1+2</i>				↑		

Le taux de fécondation a été évalué à 60 % à 120 °J par le test de révélation à l'acide chlorhydrique. Aucune différence significative de mortalité des individus n'a été observée entre les conditions (**Figure 25**).

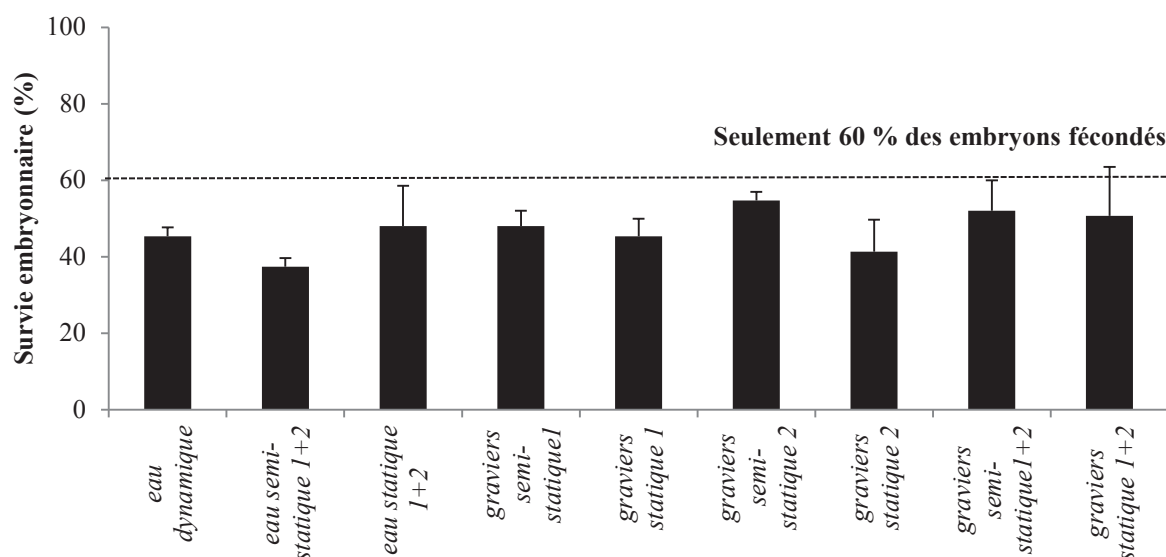


Figure 25. Survie embryonnaire à 180°J (%). (Anova, $p < 0,05$, $N = 3$, aucune différence significative).

Aucune différence significative n'a été observée entre les différents modes d'incubation au niveau de la survie des individus, du taux d'éclosion, du taux de malformation et du poids des individus. En moyenne 88 % des individus ont éclos. Seule une différence significative de la durée de développement a été observée, plus courte pour les individus développés en *eau dynamique* (**Tableau 16**).

Discussion

L'**expérience A** a mis en évidence l'importance des propriétés du sédiment sur le développement des embryons de truite. Des mortalités précoces ont été observées pour les sédiments de Pt de N, Poses et Duclair. Celles-ci peuvent s'expliquer par une toxicité de contaminants présents à des concentrations élevées dans les sédiments (Dégremont & Cachot 2009). Un colmatage des embryons pourrait aussi être la cause de mortalité précoce des individus en raison d'une forte teneur en argile et d'une granulométrie fine. En effet, (Massa et al. 2000) ont rapporté un important colmatage des embryons de salmonidés après incubation sur substrat fin, conduisant à l'hypoxie des embryons et à la production de substances toxiques pour les individus eux-mêmes. C'est pourquoi un substrat grossier tel que des graviers de tailles comprises entre 2 et 4 mm a semblé d'avantage adapté qu'un sédiment fin au développement des salmonidés.

Quelque soient les conditions d'incubation des embryons de truite (*statique* vs *dynamique*) de l'**expérience B**, les taux d'oxygène dissous ont respecté les recommandations de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (OCDE 1992). Les faibles taux de survie embryonnaire inférieurs en moyenne à 50 % pourraient s'expliquer par la mortalité progressive des œufs non fécondés. Afin de s'en prémunir, le début de l'exposition embryonnaire du test embryo-larvaire truite a été fixé à 180 °J. Le renouvellement de l'eau ainsi que l'exposition ou non à du gravier pendant le développement embryonnaire ne semble pas avoir influencé la biométrie des larves ainsi que l'apparition de malformations. Dans le but de limiter la désorption et la dilution des contaminants au cours de l'essai, le non renouvellement de l'eau pendant la période d'exposition a été sélectionné.

Au cours des 3 jours succédant le stade œillé (180 °J), seulement 0,4 % des embryons incubés dans de l'eau de source Saint Martin sont morts pour l'**expérience B**, alors que 13,3 % des embryons incubés dans de l'eau de mélange sont morts pour l'**expérience A**. L'eau de mélange composée à 33 % d'eau du robinet n'a pas semblé convenir au développement des embryons de truite en laboratoire et l'eau de source Saint Martin apparaît plus adéquate.

Conclusion

A partir des résultats des **expériences A et B**, un protocole expérimental standard pour le test embryo-larvaire truite a pu être établi. Celui-ci consiste en une incubation des embryons âgés de 180 °J jusqu'au début des éclosions sur graviers de 2 à 4 mm de diamètre. L'eau de source Saint Martin, constituant le milieu d'exposition, n'a pas été renouvelée pendant toute la durée de l'exposition. Elle a ensuite été renouvelée quotidiennement 3 jours avant le début des éclosions. Ces paramètres permettent une faible mortalité embryonnaire, un taux d'éclosion élevé, ainsi qu'une concentration en oxygène dissous saturée tout au long de l'expérience.

2.2 Mise au point du test embryo-larvaire médaka MELAc

2.2.1 Limite du sédiment naturel de référence

Introduction

Récemment, une version du test embryo-larvaire médaka MELA a été développée avec exposition par sédiment contact en utilisant le sédiment d'Yville-sur-Seine comme sédiment de référence (Vicquelin et al. 2011). Afin d'étudier la pertinence d'un sédiment naturel de référence pour le MELA deux expériences successives ont été menées pour examiner les effets de l'âge du sédiment de référence et du protocole de préparation sur la biodisponibilité des contaminants. Deux HAP modèles, le 7,12-diméthylbenzanthracène (DMBA) et le benzo[a]pyrène (BaP), ont été sélectionnés dans cette étude pour leur forte hydrophobicité, leur capacité à s'adsorber sur le sédiment, leur ubiquité dans l'environnement aquatique (Cachot et al. 2006), et leur toxicité avérée sur les jeunes stades de développement de médaka (Hornung et al. 2007, Vane et al. 2007, Vicquelin et al. 2011). Le BaP est considéré comme polluant prioritaire par la directive européenne 2000/60/EC (EC 2000). Dans un premier temps, la différence de biodisponibilité du BaP et du DMBA a été étudiée après enrobage sur du sédiment d'Yville prélevé à deux époques différentes (**expérience 1**). Dans un second temps (**expérience 2**), deux protocoles de préparation du sédiment broyé ou tamisé avant enrobage au DMBA ont été testés.

Matériel et méthodes

Le sédiment d'Yville-sur-Seine a été considéré comme sédiment de référence pour les deux expériences. Le test MELA, décrit par Vicquelin et al. (2011), a été appliqué pour les différents sédiments testés. 1X correspond à une concentration environnementale en HAP de $0.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Cachot et al. 2006). Différents paramètres ont été mesurés sur embryons ou larves: mortalité embryonnaire, mortalité larvaire, rythme cardiaque, durée de développement, taux d'éclosion, tératogénicité, taille des larves à l'éclosion, et dommages à l'ADN par le test comètes. Le test des comètes n'a pas été réalisé pour les conditions ayant induit une forte mortalité larvaire.

Pour l'**expérience 1** le sédiment d'Yville a été prélevé en 2008 et 2010, tamisé à sec puis enrobé avec deux concentrations différentes 5X et 25X de BaP et de DMBA. Les résultats de la toxicité du BaP et du DMBA sur le sédiment d'Yville 2008 ont été obtenus par Ludovic Vicquelin (Vicquelin 2011). Suite aux faibles effets des HAP modèles observés, la pertinence de deux techniques de préparation du sédiment a été évaluée. Au cours de l'**expérience 2**, le sédiment d'Yville 2010 a tout d'abord été tamisé à sec ou broyé. Le sédiment obtenu a ensuite été enrobé pour deux concentrations différentes 5X et 25X de DMBA.

Résultats

EXPERIENCE 1

Excepté pour la condition DMBA 25X, les efficacités d'enrobage ont été plus élevées en 2010 qu'en 2008. Les concentrations sédimentaires mesurées en BaP et DMBA étaient comparables pour 5X en 2008 et 2010, et pour 25X en 2008 (**Tableau 17**).

Tableau 18. Concentrations en HAP dans les sédiments enrobés en BaP et DMBA sur les sédiments d'Yville 2008 et 2010.

HAP	Concentration mesurée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Efficacité d'enrobage %)	
	2008	2010
Témoin (Yville)	-	0,003
BaP 5X	0,818 (33)	1,282 (51)
BaP 25X	5,382 (43)	9,050 (70)
DMBA 5X	0,853 (34)	1,364 (54)
DMBA 25X	6,082 (49)	5,593 (44)

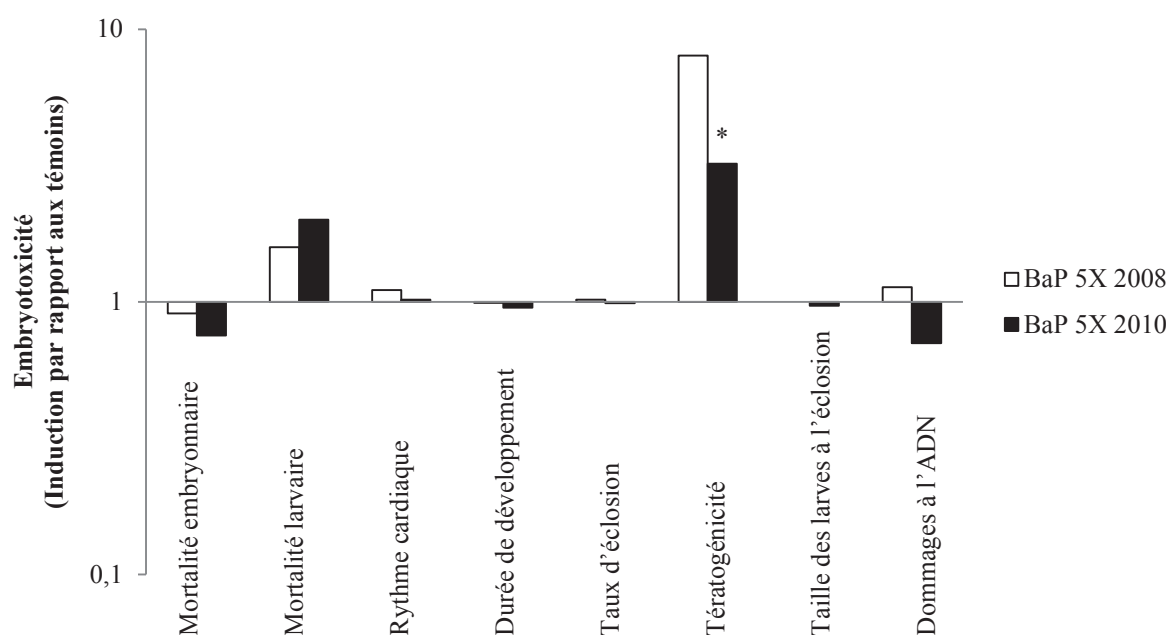


Figure 26. Variations de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de BaP ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment prélevé en 2008 ou 2010. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux témoins respectifs ($N=3$, $p < 0.05$).

L'exposition des embryons de médaka au BaP a induit une très faible toxicité (**Figure 26**). Le BaP 5X n'a induit aucune toxicité aigüe ni impact sur le rythme cardiaque, la durée de développement, la biométrie des larves ou les dommages à l'ADN. Seule une induction significative des larves malformées a été observée pour le sédiment de 2010. De la même manière, aucune toxicité n'a été observée après l'exposition des embryons au BaP 25X tous marqueurs de toxicité confondus (données non présentées).

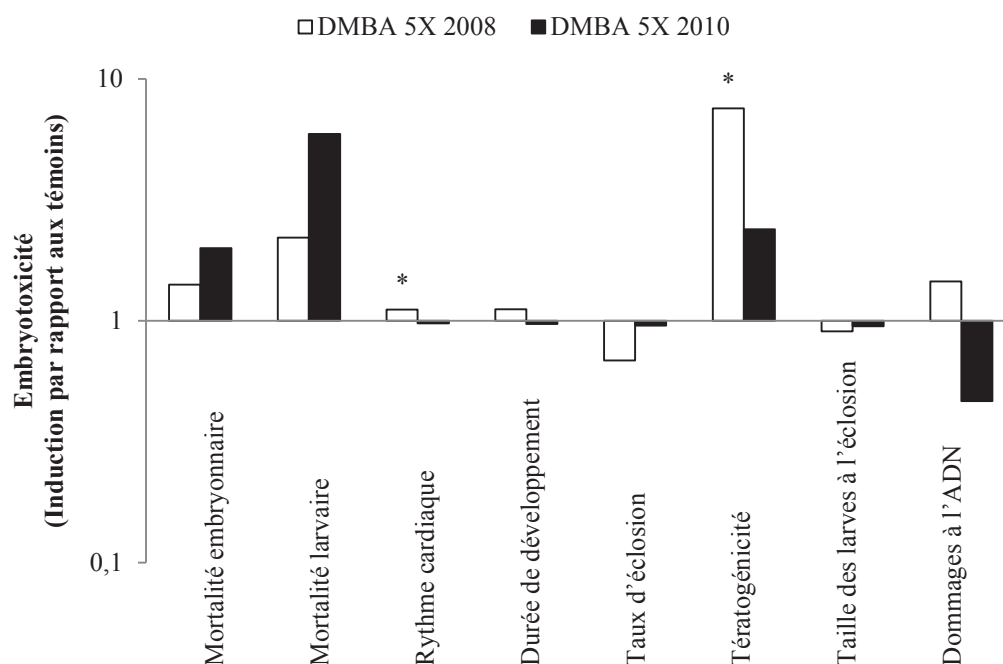


Figure 27. Variations de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de DMBA ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment prélevé en 2008 ou 2010. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux témoins respectifs ($N=3$, $p < 0.05$).

L'exposition des embryons de médaka au DMBA a induit davantage de toxicité que le BaP (**Figure 27**). Par ailleurs, un spectre de toxicité différent a été observé entre les sédiments 2008 et 2010. En effet, le sédiment enrobé au DMBA 5X 2008 a significativement induit une tachycardie et des malformations morphologiques chez les individus exposés. Aucun effet du DMBA 5X n'a été rapporté chez les individus exposés au sédiment 2010. Les sédiments enrobés en DMBA 25X ont induit davantage d'effets qu'à la concentration 5X (données non présentées). Aucun effet aigu n'a été constaté après exposition au sédiment DMBA 25X 2008. En revanche une augmentation significative du rythme cardiaque, une réduction du succès d'éclosion et une augmentation des malformations ont été observés. A l'inverse, l'exposition au sédiment DMBA 25X 2010 a induit une mortalité embryonnaire et larvaire mais pas d'effet subaigu.

EXPERIENCE 2

Tableau 19. Concentrations en HAP dans les sédiments enrobés en DMBA sur le sédiment Yville broyé ou tamisé avant enrobage.

HAP	Concentration mesurée ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (Efficacité d'enrobage %)	
	Broyé	Tamisé
Témoin (Yville)	< ld ¹	< ld
DMBA 5X	2,624 (108)	1,512 (60)
DMBA 25X	8,458 (67)	5,711 (45)

¹inférieur à la limite de détection

Les enrobages du DMBA se sont avérés plus efficaces sur un sédiment préalablement broyé que tamisé à granulométrie équivalente (**Tableau 19**). Les concentrations en DMBA étaient 1,5 plus importantes à la concentration 5X et 1,7 fois à la concentration 25X après broyage qu'après tamisage.

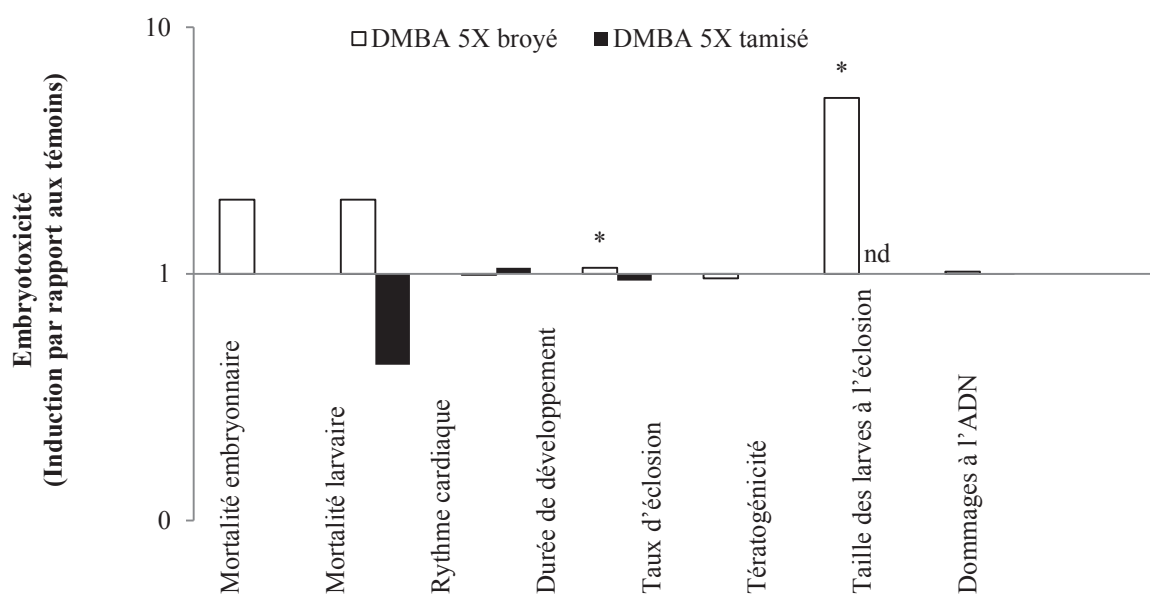


Figure 28. Variation de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 5X de DMBA ($2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment broyé ou tamisé. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs ($N=3$, $p < 0.05$).

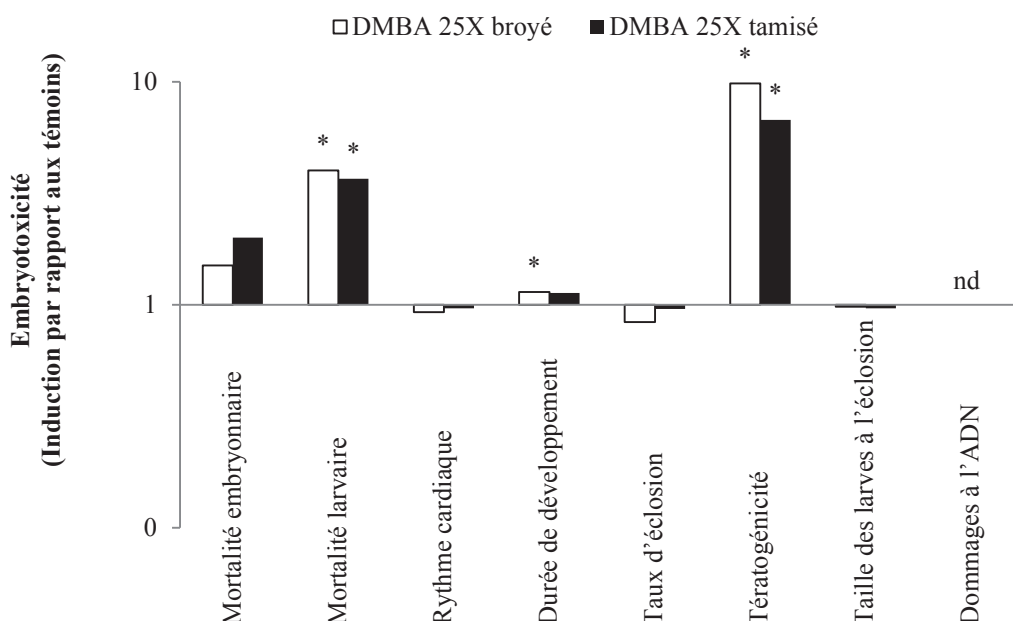


Figure 29. Variation de réponses des embryons et larves de médaka japonais exposés à 25X de DMBA ($12.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. concentration nominale) enrobés sur un sédiment broyé ou tamisé. L'abréviation nd signifie non déterminé. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs ($N=3$, $p < 0.05$).

Le spectre de toxicité du DMBA a varié suivant la préparation du sédiment (**Figure 27 & Figure 29**). L'exposition au DMBA 5X a induit des malformations chez les larves et augmenté le temps de développement lorsque le sédiment a été préalablement broyé. Aucun effet du DMBA 5X n'a été observé pour le sable tamisé. Pour le DMBA 25X les deux sédiments ont provoqués des effets tératogènes voir la mort des larves. Seul le sédiment broyé 25X a augmenté la durée de développement des embryons.

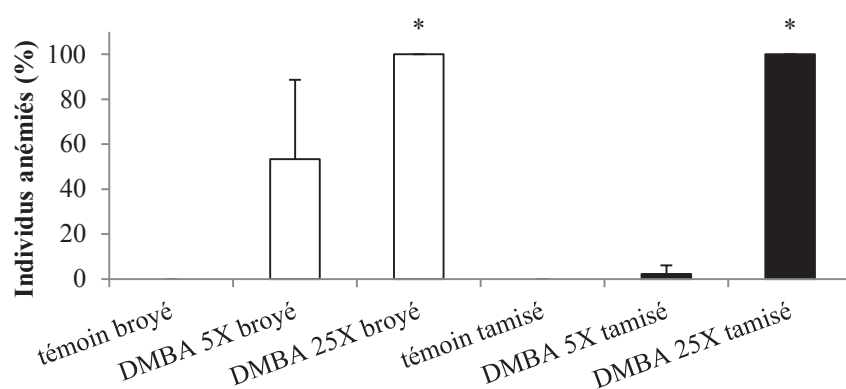


Figure 30. Le DMBA provoque des anémies chez les individus exposés à la concentration 25X. Les astérisques réfèrent à des différences significatives par rapport aux témoins respectifs ($N=3$, $p < 0.05$).

L'exposition au DMBA a majoritairement induit des malformations cardiovasculaires, en particulier des anémies (**Figure 30 & Figure 31**). A l'éclosion, respectivement 2 et 53 % des larves DMBA 5X tamisé et DMBA 5X broyé présentait des anémies. La totalité des larves exposées au sédiment enrichi en DMBA 25X tamisés et DMBA 25X broyés présentait également des anémies.

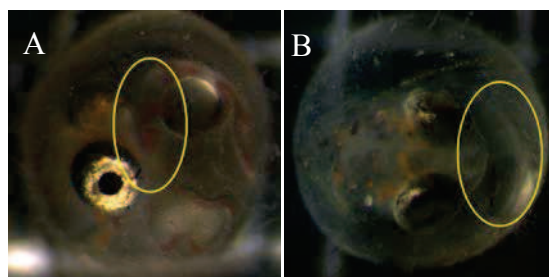


Figure 31. A - Embryon témoin 8 jours post fécondation. B - Embryon exposé au DMBA 5X (sédiment broyé) 8 jours post fécondation et montrant une absence de coloration des zones cardiaques et vitellines.

Discussion

L'**expérience 1** a révélé une influence de la période de prélèvement et donc de la composition du sédiment sur la biodisponibilité des composés enrobés sur les sédiments. La biodisponibilité des composés hydrophobes adsorbés dépend directement de la composition du sédiment comme la granulométrie des particules ou la teneur en matière organique (Akkanen et al. 2012, Fanget et al. 2002). Entre les années 2008 et 2010, la composition du sédiment d'Yville a pu évoluer et ainsi modifier les mécanismes de sorption et de désorption dirigeant la biodisponibilité des composés enrobés.

Aux concentrations testées, peu d'effet du BaP ont été observées. Pourtant la toxicité de ce composé vis-à-vis des jeunes stades de développement de poissons est largement décrite dans la littérature : effets sur le développement des embryons, cardiotoxicité (bradycardies et œdèmes péricardiques) et immunotoxicité (Carlson et al. 2004, Chikae et al. 2004, Incardona et al. 2011). (Vicquelin et al. 2011) ont également rapporté une augmentation du temps de développement et de la mortalité larvaire significative à partir de $0.85 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. de DMBA et une diminution à partir de $6.08 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. de DMBA. En revanche la toxicité du DMBA, rapportée dans ce travail, est en contradiction avec l'étude menée par Rhodes et al. qui n'observe aucun autre effet que la réduction du temps de développement à des concentrations environ équivalentes à $12,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Rhodes et al. 2005). Nos travaux concordent avec ceux de nombreuses études décrivant le syndrome du BSD (*Blue Sac Disease*) après exposition de jeunes stades de poissons aux HAP (Kiparissis et al. 2003, Rhodes et al. 2005). Une étude récente au cours de laquelle des jeunes stades de salmonidés exposés à des HAP en mélange ont présentés des anémies couplées à des retards de développement (Carls & Thedinga 2010). Dans cette étude, malgré des concentrations similaires ou plus forte en BaP, le DMBA s'est avéré plus toxique que le BaP vis-à-vis des embryons et larves de médaka japonais. Ces deux composés diffèrent par leur structure : contrairement au BaP, le DMBA présente 2 groupements méthyles et 4 au lieu de 5 cycles.

La préparation du sédiment avant enrobage a également modulé la biodisponibilité du DMBA au cours de l'**expérience 2**. Le sédiment broyé s'est révélé davantage toxique que le sédiment tamisé en particulier à la concentration 5X. Le DMBA s'adsorbe plus efficacement sur du sédiment broyé par rapport au sédiment tamisé. Le processus de broyage du sédiment pourrait augmenter la polarité des particules sédimentaires et créer de nouvelles surfaces de sorption au niveau des particules ce qui, par là même, faciliterait l'adsorption des molécules hydrophobes et ainsi augmenterait les rendements d'enrobage.

D'autre part, les conditions DMBA 2010 et DMBA 2010 tamisé des expériences **1** et **2** étaient identiques mais ont induit des effets différents. Une variation de sensibilité du lot d'œufs pourrait l'expliquer.

Conclusion

Cette étude avait pour but d'évaluer la pertinence d'un sédiment naturel de référence pour le test MELAc. De nombreuses différences de réponses des embryons et larves de médaka japonais ont été observées entre deux sédiments prélevés à des temps différents et selon leurs préparations. C'est pourquoi, dans une démarche de standardisation de l'exposition du test MELAc, un substrat d'exposition artificiel couplé à un protocole de préparation standard s'est révélé préférable à un sédiment naturel.

2.2.2 Sélection de la matière organique adéquate pour le MELAc

Introduction

Dans le but de définir la composition adéquate du sédiment artificiel, deux types de matière organique ont été testés : acide humique sous la forme de sel de sodium et tourbe blonde de sphaigne. La pertinence de l'utilisation de la tourbe a été évaluée dans l'article n° 1, et celle de l'acide humique ci-après. Le Fluo a été sélectionné comme HAP modèle pour cette expérience dans la continuité de la mise au point de la composition du sédiment artificiel.

Matériel et méthodes

L'acide humique (sel de sodium, Sigma-Aldrich) a été dilué dans 100 mL d'ERS afin d'obtenir des concentrations finales en acide humique de 0 %, 1 %, 5 %, et 10 % p.s.. La solution a été agitée à température ambiante 110 rpm pendant 24 h. Puis l'argile kaolinite et le sable ont été ajoutés à la solution et agités pendant 4 h à 110 rpm, le pH a été ajusté $7 \pm 0,5$, et le mélange a été décanté pendant 24 h. L'eau surnageante a ensuite été enlevée et le sédiment séché à l'étuve pendant 24 h à 90 °C. Les sédiments contenant différentes concentrations d'acide humique ont été ultérieurement enrobés soit en solvant dichlorométhane uniquement, soit une concentration cible de Fluo équivalente à $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s.. Le test MELAc a été conduit suivant le protocole décrit dans l'article n°1.

Résultats

Une synthèse des résultats est présentée dans le **Tableau 20** ci-après.

Tableau 20. Effets de la concentration d'acide humique dans les sédiments enrobés en Fluo sur le développement des médaka japonais. Les astérisques réfèrent à une différence significative avec le contrôle solvant respectif pour chaque concentration de tourbe (Moyenne \pm ET, N = 3, Test Student, $p < 0.05$).

Acide humique	0%		1 %		5 %		10 %	
	Solvant	Fluo	Solvant	Fluo	Solvant	Fluo	Solvant	Fluo
Concentration en Fluo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,000	9,977	0,000	7,430	0,001	8,753	0,000	7,483
Survie embryonnaire (%)	97,3 \pm 2,3	97,3 \pm 2,3	98,7 \pm 2,3	100,0 \pm 0,0	97,3 \pm 2,3	97,3 \pm 2,3	94,7 \pm 2,3	98,7 \pm 2,3
survie larvaire (%)	100,0 \pm 0,0	95,8 \pm 4,2	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	98,6 \pm 2,5	94,2 \pm 5,0	95,9 \pm 4,0
Taux d'éclosion (%)	97,3 \pm 4,6	94,6 \pm 2,3	98,7 \pm 2,3	98,7 \pm 2,3	96,0 \pm 4,0	94,7 \pm 2,3	93,3 \pm 4,6	97,3 \pm 2,3
Rythme cardiaque (batt.min⁻¹)	109,2 \pm 7,1	114,7 \pm 4,5	105,3 \pm 11,9	111,2 \pm 4,4	111,3 \pm 4,4	109,4 \pm 4,4	113,4 \pm 2,8	109,5 \pm 1,7
Temps de développement (jour)	9,9 \pm 0,1	10,4 \pm 0,3*	10,4 \pm 0,2	10,7 \pm 0,3	10,7 \pm 0,2	11,0 \pm 0,1	10,5 \pm 0,2	11,2 \pm 0,4*
Longueur totale (mm)	4,7 \pm 0,0	4,6 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1
Longueur tête (mm)	1,00 \pm 0,01	0,98 \pm 0,03	0,96 \pm 0,02	0,96 \pm 0,01	0,97 \pm 0,05	0,96 \pm 0,02	0,98 \pm 0,03	0,97 \pm 0,02
Aire vitellus (mm²)	0,32 \pm 0,04	0,35 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,41 \pm 0,03	0,38 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04	0,36 \pm 0,00
Locomotion Distance parcourue (m)	3,6 \pm 0,9	4,7 \pm 0,5*	4,3 \pm 0,6	5,7 \pm 0,4	5,6 \pm 0,2	8,2 \pm 2,3	4,4 \pm 0,8	5,7 \pm 0,3
Gonflement vessie natatoire (%)	9,3 \pm 2,3	12,0 \pm 10,6	34,7 \pm 2,3	18,7 \pm 2,3	37,3 \pm 12,2	24,0 \pm 8,0	36,0 \pm 10,6	21,3 \pm 19,7
Larves malformées (%)	17,8 \pm 13,9	13,3 \pm 6,7	13,3 \pm 6,7	42,7 \pm 21,0	15,6 \pm 15,4	15,6 \pm 10,2	24,4 \pm 23,4	26,7 \pm 11,5
Œdème (%)	0,0 \pm 0,0	2,2 \pm 3,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	4,4 \pm 3,8
Squelettique (%)	8,9 \pm 7,7	20,0 \pm 11,5	15,6 \pm 13,9	24,4 \pm 20,4	13,3 \pm 6,7	11,1 \pm 3,8	8,9 \pm 15,4	22,2 \pm 13,9
Cranio-faciale (%)	0,0 \pm 0,0	6,7 \pm 6,7	2,2 \pm 3,8	0,0 \pm 0,0	2,2 \pm 3,8	8,9 \pm 3,8	2,2 \pm 3,8	11,1 \pm 10,2
Cardiaque (%)	2,2 \pm 3,8	6,7 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	6,7 \pm 6,7	0,0 \pm 0,0	2,2 \pm 3,8	6,7 \pm 6,7	4,4 \pm 3,8

Les concentrations en Fluo dans le sédiment ont varié entre 7,4 et 10,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s.. Aucun effet aigu de l'acide humique ni du Fluo n'a été observé sur les embryons de médaka japonais en terme de survie embryonnaire, de survie larvaire et de taux d'éclosion. Les mesures du rythme cardiaque, de la longueur totale, de la longueur de la tête, de l'aire du vitellus et du gonflement de la vessie natatoire, n'ont pas non plus révélé d'effet toxique de la composition du sédiment. Aucune malformation n'a été observée.

Le Fluo a augmenté la durée du temps de développement pour 0 % et 10 % d'acide humique. De plus les larves exposées au Fluo ont parcouru une distance plus longue que les larves témoins pour le sédiment sans acide humique.

Discussion

La toxicité du Fluo vis-à-vis des organismes a été démontré sur différentes espèces (Lotufo 1998, Matson et al. 2008b, Morin et al. 2011, Selck et al. 2005). Cependant cette étude a mis en évidence peu d'effets toxiques de ce composé sur les embryons et larves de médaka japonais. L'ajout d'acide humique dans le sédiment ne semble pas avoir amélioré la biodisponibilité du Fluo par les embryons exposés. Cela pourrait être expliqué par la dilution de l'acide humique lors de la mise en suspension des sédiments. Le milieu étant renouvelé tous les jours, la concentration en acide humique s'est appauvrie. Or les molécules de polluants organiques hydrophobes tel que le Fluo se lient préférentiellement à l'acide humique (Fanget et al. 2002, Jones & Tiller 1999). Il se pourrait donc que la concentration d'exposition en fluoranthène ait aussi diminué au cours de l'expérience. Nos résultats complètent l'étude *in vitro* de (Bittner et al. 2011) qui ont comparé l'effet de différentes matières organiques dissoutes sur l'interaction des composés avec l'Ahr. Ils ont en effet démontré que la présence de certaines matières organiques dissoutes favoriserait le transport des composés organiques à travers les cellules et augmenterait leur toxicité. Ce n'était pas le cas du Fluo en présence d'acide humique Sigma-Aldrich qui n'a pas induit de toxicité cellulaire apparente.

Conclusion

L'apport de matière organique sous forme d'acide humique n'a pas permis une biodisponibilité adéquate des molécules de Fluo enrobées sur le sédiment. Un autre type de matière organique a dû être envisagé. L'article n°1 décrit le développement d'un sédiment artificiel adapté au test MELA. La pertinence de l'utilisation d'une matrice plus complexe et plus stable que l'acide humique est proposée, celle de la tourbe blonde de Sphaigne.

2.2.3 Article n°1 : Mise au point d'un sédiment artificiel de référence adéquat au MELAc

Les expériences précédentes ont démontré que le comportement de molécules enrobées sur sédiment varie suivant la composition du sédiment et le protocole de préparation. De part leur variabilité de composition, les sédiments naturels ne permettent pas de garantir la répétition à l'identique des processus d'adsorption et de désorption des polluants. De plus les sédiments naturels ne peuvent pas être considérés comme totalement dépourvus de contamination. En tenant compte de ces limites, l'utilisation d'un sédiment artificiel de référence s'avère une

solution pour standardiser les tests évaluant la toxicité des polluants hydrophobes sur les stades précoces de développement (SPD) de poissons. L'article n° 1 détaille le développement et la validation d'un sédiment artificiel de référence adapté au test embryolaire médaka avec exposition par sédiment contact (MELAc) en deux temps.

Dans un premier temps, la composition du sédiment adéquate au MELAc a été déterminée en utilisant un HAP modèle, le fluoranthène (Fluo). Ce composé est largement représenté dans les écosystèmes aquatiques contaminés et sa toxicité vis-à-vis des SPD de poissons est documentée. Trois constituants du sédiment ont été évalués: du sable, de l'argile et de la matière organique. Trois expériences successives ont permis de déterminer la granulométrie, la teneur en argile et la teneur en matière organique adéquates en maximisant le rendement d'enrobage et la toxicité du Fluo vis à vis des SPD d'*Oryzias latipes* tout en minimisant la toxicité du sédiment non dopé. La première expérience consistait à déterminer la granulométrie de sable la plus adéquate au MELAc. Malgré de faibles rendements d'enrobage dus à une matrice composée de silice uniquement, le Fluo a induit des effets embryotoxiques. L'intensité de ces effets s'est révélée dépendante de la granulométrie du sable. L'ajout d'argile dans la composition du sédiment au cours de la deuxième expérience a amélioré l'efficacité d'enrobage du Fluo. Une fois adsorbé sur le complexe sable-argile, le Fluo a été faiblement biodisponible pour les embryons de médaka et peu d'effets toxiques ont été induits. La troisième expérience a montré que l'ajout de matière organique était un des facteurs majeurs contrôlant la biodisponibilité des HAP dans le sédiment. Les interactions matière organique-argile ont limité l'adsorption des molécules de Fluo sur la matrice sédimentaire. Les composés hydrophobes se retrouvent piégés dans la structure complexe de la matière organique alors que les liaisons avec le sable ou l'argile sont plus durables. La biodisponibilité des molécules de HAP est guidée par deux mécanismes majeurs qui dépendent du scénario d'exposition : le mécanisme de sorption gouverné en majorité par les substances humiques, et celui de facilitation du transport de HAP en présence de matière organique dissoute. Au final, la composition adéquate du sédiment artificiel de référence pour l'évaluation de la toxicité des composés hydrophobes par le MELAc a été fixée à : 2,5 % p.s. de tourbe de Sphaigne, 5 % p.s. d'argile kaolinite, et 92,5 % p.s. de sable de granulométrie comprise entre 0,2 et 0,5 mm.

Dans un second temps, la composition finale du sédiment artificiel a été validée avec plusieurs concentrations de Fluo et des répétitions des expositions au Fluo. Des légères différences du développement des individus témoins ont été observées, avec des coefficients de variation en moyenne inférieurs à 10 %. Ceci pourrait s'expliquer par une variation de la qualité du lot d'oeufs. L'exposition à plusieurs concentrations de Fluo a induit de manière dose-dépendante une augmentation des anomalies morphologiques et une diminution de la taille totale des individus.

Puis le sédiment artificiel a été utilisé pour caractériser la toxicité à deux autres HAP modèles : le benzo(a)anthracène (BaA) et le benzo(a)pyrène (BaP). Tout comme le Fluo, le BaA et le BaP ont induit des effets sur le développement embryonnaire du médaka japonais. Le Fluo et le BaP sont tous les deux des polluants prioritaires listés par la directive européenne 200/60/EC ([EC 2000](#)). La toxicité des trois HAP a été directement liée à leur coefficient log de Koc et donc leur biodisponibilité. Ces résultats mettent en évidence une forte sensibilité des SPD de médaka japonais au HAP enrobés sur particules sédimentaires. Cette matrice sédimentaire est adaptée au développement des embryons de médaka japonais. Elle permet une importante et reproductible sorption des HAP de différents poids moléculaires. Afin de pleinement valider cette nouvelle matrice, la toxicité d'autres polluants hydrophobes seuls et en mélange devrait être évaluée.

ARTICLE I

Le Bihanic F, Perrichon P, Landi L, Clérandeau C, Menach K, Budzinski H, Cousin X, Cachot J (2014): Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environ Sci Pollut Res*, 1-14

Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay

Florane Le Bihanic · Prescilla Perrichon · Laure Landi ·
Christelle Clérandeau · Karyn Le Menach ·
Hélène Budzinski · Xavier Cousin · Jérôme Cachot

Received: 29 June 2013 / Accepted: 27 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Most persistent organic pollutants, due to their hydrophobic properties, accumulate in aquatic sediments and represent a high risk for sediment quality. To assess the toxicity of hydrophobic pollutants, a novel approach was recently proposed as an alternative to replace, refine and reduce animal experimentation: the medaka embryo–larval sediment contact assay (MELAc). This assay is performed with Japanese medaka embryos incubated on a natural sediment spiked with the compound being tested. With the aim of improving this assay, our study developed a reference exposure protocol with an artificial sediment specifically designed to limit natural sediment composition uncertainties and preparation variability. The optimum composition of the new artificial sediment was tested using a model polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), fluoranthene. The sediment was then validated with two other model PAHs, benz[*a*]anthracene and benzo[*a*]pyrene. Various developmental end points were recorded, including survival, embryonic heartbeat, hatching delay, hatching success, larval biometry and abnormalities. The final artificial sediment composition was set at 2.5 % dry weight (dw) *Sphagnum* peat, 5 % dw kaolin clay and

92.5 % dw silica of 0.2- to 0.5-mm grain size. In contrast with natural sediments, the chemical components of this artificial matrix are fully defined and readily identifiable. It is totally safe for fish embryos and presents relatively high sorption capacities for hydrophobic compounds. Studies with other hydrophobic and metallic contaminants and mixtures should be performed to further validate this artificial sediment.

Keywords Artificial sediment · Spiked sediment · PAHs · Japanese medaka embryos · Embryotoxicity · Teratogenicity

Abbreviations

PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
Fluo	Fluoranthene
BaA	Benz[<i>a</i>]anthracene
BaP	Benzo[<i>a</i>]pyrene
dpf	Days post-fertilisation
MELA	Medaka embryo–larval assay
dw	Dry weight
ERS	Egg rearing solution
ELS	Early life stage

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-014-2607-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Le Bihanic · L. Landi · C. Clérandeau · K. Le Menach ·
H. Budzinski · J. Cachot (✉)
University of Bordeaux, EPOC UMR CNRS 5805, 33405, avenue
des Facultés, Talence Cedex, France
e-mail: j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr

P. Perrichon · X. Cousin
IFREMER, Ecotoxicology laboratory, Place Gaby Coll, BP7,
17137 l'Houmeau, France

X. Cousin
INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Introduction

Due to their high capacity to sorb and store contaminants, aquatic sediments are major sinks for persistent organic pollutants and thereby secondary sources of contamination for aquatic ecosystems (Harris et al. 1996). Sediments represent a real threat for all organisms living in contact with sediment or feeding from them. Organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are ubiquitous in the natural environment. Several studies have documented PAH concentrations of up to 50 µg g⁻¹ dry weight (dw) sediment in various affected aquatic ecosystems in Europe (Baumard

et al. 1999; Benlahcen et al. 1997; Cachot et al. 2006). Multi-exposure to PAHs can occur directly from the contaminated sediment, from the molecules adsorbed onto suspended particles or dissolved in the water column, or indirectly through consumption of benthic prey (Cailleaud et al. 2007; Mayer et al. 2007; ter Laak et al. 2009). The bioavailability of chemical compounds accumulated in sediments depends on several parameters, either physicochemical, such as molecule desorption organic matter content, overlying water properties and particle size, or external factors, such as dredging, storms, flood, tides and bioturbation (Roberts 2012; Cailleaud et al. 2009; Wölz et al. 2008; Sundberg et al. 2007).

The usefulness of fish early life stages (ELS) for chemical testing has been widely described in the literature (Belanger et al. 2010; Embry et al. 2010; Vicquelin et al. 2011), mainly because ELS are very sensitive to a large variety of chemicals (Lammer et al. 2009). Tests using fish embryos and eleutheroembryos (yolk-sac larvae) are not considered in vivo tests by EU regulations on the protection of animals used for scientific purposes (EC 2010). Fish ELS assays also fulfil the requirements of European REACH regulations on the reduction, refinement and replacement of animals for toxicity assessment of chemicals (EC 2006). More recently, sediment contact assays using ELS have been proposed as an alternative to classic ecotoxicity assays for chemical testing (Barjhoux et al. 2012; Vicquelin et al. 2011) and assessment of sediment toxicity (Hollert et al. 2003; Kosmehl et al. 2006; Rocha et al. 2011). These assays better reproduce the multiple sources of exposure to benthic organisms via sediment, particle and dissolved phases than waterborne exposure.

Japanese medaka (*Oryzias latipes*) was selected primarily for its high sensitivity at early life stages to organic contaminants (Barjhoux et al. 2012; Cachot et al. 2007, 2008; Farwell et al. 2006; Vicquelin et al. 2011) and its ability to bioaccumulate various classes of pollutants during the initial hours of development (McElroy et al. 2006; Hornung et al. 2004). In addition, Japanese medaka is easy to breed and has a transparent chorion, making it possible to track each stage of embryonic development during exposure. Furthermore, the developmental biology of Japanese medaka has been accurately described in previous literature (Iwamatsu 2004). Lastly, the baseline mortality of embryos and sac fry is particularly low, at around 10 % (Barjhoux et al. 2012; Vicquelin et al. 2011). A sediment contact version of the medaka embryo-larval assay (MELAc) was recently developed for organic (Cachot et al. 2007; Vicquelin et al. 2011) and metallic pollutant testing (Barjhoux et al. 2012). Because natural sediment composition varies over time, its use in pollutant toxicity testing can be controversial (Bouloubassi et al. 2006). Since the behaviour of a spiked pollutant depends on sediment composition (Höss et al. 2010; Hsu et al. 2007), the process of adsorption and desorption can vary according to the composition of natural sediments. Natural sediments cannot be

considered totally free of contamination. Taking this into consideration, the use of a chemically spiked artificial sediment is a solution that could allow the standardisation of assays for hydrophobic pollutant testing. Whilst an artificial sediment is already available for chemical testing on chironomids (OECD 2004), it is not suitable for fish development. Its elevated clay content (20 % dw) may clog the chorion of embryos and thus prevent gas exchanges and impair embryonic development.

This study aims to develop and validate a new reference artificial sediment for toxicity testing of hydrophobic chemicals using the MELA sediment contact assay. The first step was to form the artificial sediment from three components: sand, clay and organic matter. This was then tested using fluoranthene (fluo). Three consecutive experiments were performed to select a suitable grain size for sand and organic matter based on three criteria: maximal fluo spiking efficiency, maximal fluo toxicity and safety of the solvent control sediment for medaka embryo development. Fluo was selected as a model pollutant for its high hydrophobicity, high absorption capacity for particles and organic matter, and common presence in the aquatic environment (Guasch et al. 2012; Cachot et al. 2006). The second step consisted of validating the final composition of the artificial sediment with several fluo concentrations, with repeated fluo exposures. This was also applied to two other model PAH compounds: benz[a]-anthracene (BaA) and benzo[a]pyrene (BaP).

Materials and methods

Chemicals

Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) supplied fluo, BaP and BaA, as well as ethyl 4-aminobenzoate (benzocaine). Spiking solutions of fluo at $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, BaP at $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ and BaA at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ were all prepared in isooctane (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, Spain). Atlantic Labo (Bruges, France) supplied pentane solvent. Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands) and Acros Organics (Thermo fisher Scientific, Geel, Belgium) supplied the dichloromethane solvent.

Artificial reference sediment preparation

Three consecutive experiments were performed to ascertain the most suitable composition for the artificial sediment in terms of sand grain size (experiment 1A), clay content (experiment 1B) and organic matter content (experiment 1C), as illustrated in Fig. 1. Three criteria were used to select the most suitable sediment composition: maximum spiking efficiency, maximal fluo toxicity and lack of toxicity detected in the solvent control sediment. The composition and the

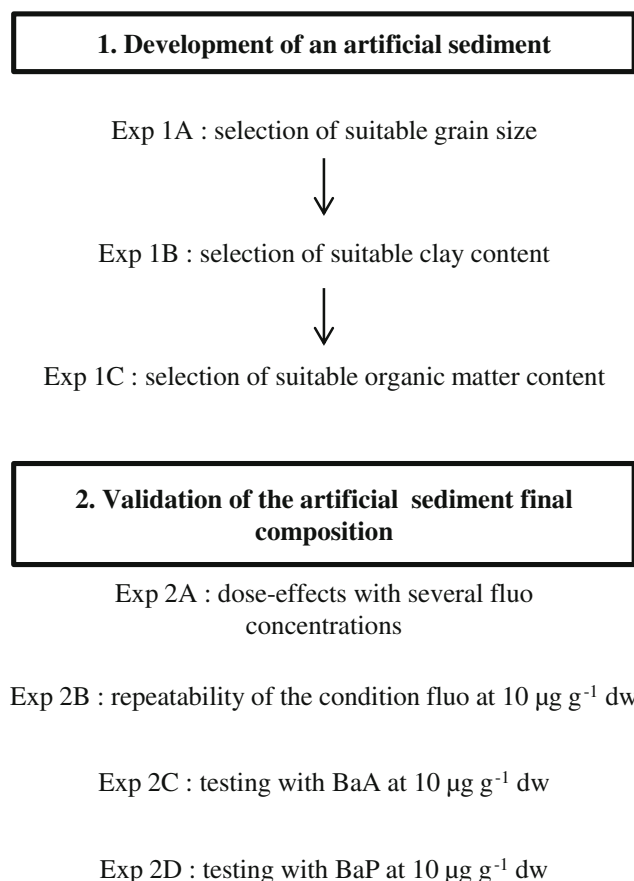


Fig. 1 Outlines of the different series of experiments carried out for the development and validation of an artificial reference sediment specifically designed for the medaka embryo–larval assay in sediment contact (MELAc)

preparation of the artificial sediment were based on the OECD 218 (OECD 2004) and recent works from Nia et al. (2011) and Zielke (2011).

Experiment 1A aimed to select the size of sand grain suitable for hydrophobic compound testing with the MELAc test. Sand supplied by Sibelco (sand reference BB 0.2/2h, Mios, France) was washed once with hydrochloric acid (7 %) then rinsed generously with Milli-Q water before being used. After 24 h of drying at 90 °C, the sand was sieved and placed into three categories: particles below 0.2 mm, particles between 0.2 and 0.5 mm, and particles between 0.5 and 2 mm. The 0.2- to 0.5-mm sand fraction appeared the most suitable for chemical testing with the MELAc and was selected to make up the artificial sediment used in our experiments.

Experiment 1B aimed to define the most suitable clay content in the artificial sediment. Kaolin clay (Merck, Darmstadt, Germany) was added to 0.2- to 0.5-mm sand fractions for final clay concentrations of 0, 7.5, 15 or 30 % dw in glass bottles. Sediment was moistened with Milli-Q water 1:4 (v/v), mixed at 180 rpm for 4 h and then dried for 24 h at 90 °C. Clay was shown to affect hatching success during exposure, even at

the lowest concentration tested, 7.5 % (data not shown). Consequently, the clay content in the artificial sediment was set at 5 % to avoid embryo clogging.

Experiment 1C aimed to establish the most suitable organic matter content in the artificial sediment. *Sphagnum* blond peat (Florentaise, St Mars du Désert, France) was dried for 48 h and then sieved to retain only those particles below 0.5 mm. Blond peat was moistened with Milli-Q water (1:25, v/v) and then mixed for 48 h at 180 rpm. Humid peat at 0, 2.5 or 5 % dw final concentration was then added to the 0.2 to 0.5-mm sand fraction supplemented with 5 % of clay. The sediment was then mixed by continuous shaking at 180 rpm for an additional 24-h period. The pH was then adjusted to 6.5 using calcite solution (10 % in Milli-Q water). After 7 days of storage at room temperature for stabilisation, 1:4 (v/v) of Milli-Q water was added to the sediment in each bottle. Supernatant water was removed after 24 h decantation. The sediment was then dried at 105 °C for 14 h without shaking. After testing, peat content in the artificial sediment was set at 2.5 %.

Experiments 2A, 2B, 2C and 2D aimed to validate the composition of the artificial sediment: 92.5 % 0.2- to 0.5-mm grain size, 5 % clay and 2.5 % peat. The 10-µg g⁻¹ dw fluo treatment was repeated in experiments 1C, 2A and 2B using three different batches of artificial sediment. The three batches of sediment were prepared and spiked separately to perform independent statistical analyses. For experiment 2A, three different fluo concentrations were tested: 3, 10 and 30 µg g⁻¹ dw. Experiments 2C and 2D aimed to validate the artificial sediment using two other model PAHs with different *K*_{ow} and thus different physicochemical and toxicological properties. BaA toxicity was assessed in experiment 2C and BaP in experiment 2D.

Sediment spiking

Individual PAH nominal concentration was set to 10 µg g⁻¹ dw, a value previously reported for total PAHs in sediments from the Upper Seine estuary (Cachot et al. 2006). For experiments 1A, 1B, 1C and 2B, the sediment was spiked only with solvent (as a control) or with 10 µg g⁻¹ dw nominal fluo concentration. For experiment 2B, the sediment was spiked only with solvent or with 3, 10 or 30 µg g⁻¹ dw nominal fluo concentrations. For experiments 2C and 2D, the sediment was spiked only with solvent or with 10 µg g⁻¹ dw of BaA or BaP nominal concentration. Artificial sediment (30 g dw), dichloromethane (60 mL) and spiking solution were added to a 250-mL glass flask. The solvent was evaporated with a rotary evaporator Rotavapor (IKA, Staufen, Germany) at 115 rpm, 45 °C for 50–60 min. To ensure elimination of residual solvent, spiked sediments were stored overnight in the dark at room temperature under a fume hood (Vicquelin et al. 2011). For each spiked sediment, one sample of 5 g aliquots was kept

for chemical analysis. Spiked sediments were stored in the dark at ambient temperature and usually used within 2 days.

Physicochemical characterisation of the artificial sediment

The particle size distribution of the sediment was determined by diffractometry. Artificial reference sediment was moistened and mixed with egg rearing solution (ERS) 24 h at 100 rpm. Pore water was then extracted from the sediment by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min and stored at -20°C prior analysis. Dissolved ammonium in pore water was quantified using a colorimetric method (Strickland and Parsons 1972) and the particulate organic carbon concentration of the sediment by infrared spectroscopy (Etcheber et al. 1999). These three analyses were performed in triplicate.

PAH analysis in sediment

Sediment samples were stored at -20°C before analysis. Internal deuterated standards fluo d10, chrysene d12 and BaP d12 were added prior to the extraction of 0.2 g of sediment and to one blank analysis. PAH compounds were extracted for 10 min at 30 W using microwave extraction with dichloromethane as a solvent (Budzinski et al. 2000). Samples were then re-concentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap Labconco, Kansas City, MO). Concentrated extracts were purified using alumina micro-columns and eluted with 3×5 mL of dichloromethane. After another re-concentration step, the aliphatic fraction was eluted on a silica micro-columns using a mixture of pentane/dichloromethane (65:35, v/v). Finally, samples were concentrated in isooctane and then pyrene d10 and benzo[b]fluoranthene d12 were both added as syringe standards before injection. Fluo, BaA and BaP molecules were analysed with gas chromatography coupled to mass spectrometry as described by Baumard et al. (1998). The average extraction efficiencies for all compounds were generally very satisfactory, at $70.0 \pm 9.4\%$ for fluo, $95.0 \pm 13.0\%$ for BaA and $87.2 \pm 14.6\%$ for BaP (mean \pm SD). The entire analytical procedure was applied to the certified marine sediment SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD) with grain size, organic carbon content and PAH concentration (NIST 2008) comparable to the artificial sediment used in the present study.

Embryo collection and exposure

Gis-Amagen (INRA, Jouy-en-Josas, France) provided Japanese medaka (*O. latipes*) embryos (CAB strain) at early gastrula, stages 14–15 (Iwamatsu 2004). Embryos at 1 day post-fertilisation (dpf) were placed into a Nitex® thermoformed basket which was in turn placed onto the surface of the sediment. Exposure by sediment contact was performed throughout embryonic development from 1 dpf until hatching.

Exposures, replicated three times per condition, were carried out in 35-mm diameter plastic Petri dishes (Greiner, Courtaboeuf, France) containing 3 g dw of sediment, 3 mL of ERS (1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl_2 and 0.163 MgSO_4 in 1 L Milli-Q autoclaved water) and 25 embryos. During exposure, the ERS medium was renewed daily. Experiments took place in a climate chamber (Snijders Scientific, Tilburg, the Netherlands) at $26 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ with a light/dark photoperiod of 12:12 and 5,000-lx white light. When more than half of the individuals hatched in the three replicates of a single condition, exposure was then stopped for all conditions. After hatching, pro-larvae were observed and transferred into a glass beaker containing 20 mL of mixed water (dechlorinated tap water mixed with distilled water 1:2, v/v, aerated for 24 h). At the end of the exposure, non-hatched embryos were transferred into new plastic Petri dishes containing 3 mL ERS without sediment until hatching. Three days after hatching, the experiment was stopped by euthanizing all remaining larvae and embryos with a lethal dose of 120 mg L^{-1} ethyl 4-aminobenzoate. Pro-larvae were not fed during the experiment.

Dissolved oxygen concentration was measured daily before ERS renewal in each exposure unit with a fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany). Measurements were compensated with a temperature sensor PT 1000. After 3 min of oxygen and temperature sensor stabilisation, data were recorded using OxyView v6.02 software (PreSens Precision Sensor). The oxygen probe was placed at the interface between the ERS and the sediment.

Embryo–larval assay

Dead embryos and larvae were recorded daily and immediately removed to avoid alteration of the medium. Embryonic survival referred to the number of live embryos or hatched larvae at the end of the experiment compared to the number of embryos at 24 h of exposure. Embryos that died within the first 24 h of the test (2–5 %) were not taken into consideration for the calculation since this was likely to be related to transportation stress. Larval survival referred to the number of larvae alive at the end of the experiment compared to the total number of hatched individuals. Hatching rate referred to the number of hatched individuals compared to the number of live embryos at 24 h. Hatching time referred to the number of days that embryos took to develop, from fertilisation to hatching.

Heartbeat was recorded at room temperature $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ on 7 dpf embryos temporarily transferred to an ERS medium to facilitate measurement. It was registered under a stereomicroscope (MZ 7.5 Leica, Nanterre, France) at $\times 25$ magnification coupled with a halogen cold light source (Intralux 4100, Volpi, Schlieren, Switzerland). Heartbeat was counted over three

periods of 20 s for the same embryo. Values were summed to obtain beats per minute data for each embryo. Five individuals were analysed per replicate.

At hatching, 15 larvae per replicate were individually examined to record morphological abnormalities and lesions. Observed larvae were randomly selected and photographed at $\times 25$ magnification with a stereomicroscope (MZ7.5 Leica) coupled with a CDD camera (DFP420C Leica). Five types of abnormalities and lesions were scored: oedema (yolk sac, pericardia and skeletal); spinal (scoliosis, lordosis, kyphosis and tail bud abnormalities); craniofacial (jaw and skull abnormalities); ocular (missing eye, cyclopia, hypertrophy or atrophy); and cardiac (anaemia, haemorrhage, ventricle size, blood circulation and heart position). Abnormalities were scored using a scale of five points, i.e. one point per malformation type. One larva could exhibit several abnormality types and/or several malformations of the same type (counted once). Percentage of abnormal larvae referred to the number of larvae presenting at least one abnormality in comparison to the number of observed individuals.

Head length (from terminal point of the lower jaw to rear operculum), total body length (from terminal point of the lower jaw to the end of caudal fin) and yolk sac area (excluding swim bladder area) were measured between 0 and 24 h post-hatching, on 15 larvae per condition. Swim bladder inflation was also reported. These measurements were processed using Leica Microsystems software v3.8.

Statistical analysis

For all experiments, each exposure condition was identically replicated three times. Each replicate was an independent sample and the solvent treatment was considered as a control treatment. Data are indicated as the mean \pm SD. Variance homogeneity was assessed using the *F* test ($p < 0.01$), and each fluo-contaminated sediment was compared to its respective solvent treatment with Student's *t* test ($p < 0.05$). For experiment 1C, peat toxicity was statistically analysed for the three different peat concentrations. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro–Wilk test ($p < 0.01$). Variance homogeneity was evaluated using the Levene test ($p < 0.05$). In cases of homogenous variance and normalized data, ANOVA was performed followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). In opposite case, data were analysed using the Kruskal–Wallis non-parametric test ($p < 0.05$). Principal component analysis (PCA, two-axis) was performed on endpoints for which significant differences were observed. Statistical analyses were performed using Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Coefficients of variation were calculated to evaluate the repeatability of the exposure to fluo-spiked artificial sediment.

Results

Development of an artificial sediment

The suitable composition of artificial sediment was evaluated regarding sand grain size (1A), clay content (1B) and peat content (1C). No significant mortality was observed in experiments 1A–1C. For solvent-spiked sediments, the only toxicity recorded was a significantly increased heartbeat in embryos reared onto 0.5- to 2-mm sediment fractions compared to <0.2 -mm or 0.2- to 0.5-mm sediment fractions ($p = 0.043$). Fluo spiking efficiency reached 49, 25 and 34 % for the <0.2 -, 0.2- to 0.5- and 0.5- to 2-mm fractions, respectively (Table 1). Fluo exposure did not significantly affect either hatching rate or larvae morphology. However, fluo exposure significantly increased embryonic heartbeats. For the <0.2 -mm sediment fraction, heartbeats of fluo-exposed embryos were 10 % higher than in control embryos (Fig. 2a). For the 0.2- to 0.5-mm fraction, fluo-exposed larvae hatched significantly earlier than in the solvent control group ($p = 0.040$). Therefore, fluo larvae were significantly smaller at hatching ($p = 0.004$). Time to hatch and larvae total length were respectively 6.1 and 4.3 % significantly lower than in the control (Fig. 2b, c). Moreover, the principal component analysis explained 76 % of the variances based on four endpoints: heartbeat, larvae total length, hatching time and larval abnormality score (Fig. 2d). In this figure, the 0.2- to 0.5-mm solvent group was anti-correlated with the fluo treatment group, with high normalized coefficients along the first axis of the PCA (52.3 %). Therefore, the 0.2- to 0.5-mm sediment fraction was selected as the most suitable fraction for artificial sediment.

Addition of clay to the sediment of up to 15 % significantly increased fluo spiking efficiency from 63 to 105 % (Table 1). Although there was no significant mortality (see Electronic supplementary material (ESM) Table 1), the addition of 15 % of clay to the solvent control tended to decrease the hatching rate by 9.5 % compared to the solvent control containing 0 % of clay (Fig. 3a). In contrast, larvae exposed to fluo-spiked sediment without clay hatched 0.7 dpf later than the corresponding control solvent group ($p = 0.046$; Fig. 3b). For 7.5 % clay, fluo significantly decreased the hatching rate by 12 %. At 15 % clay content, contaminated larvae were significantly longer (+0.12 mm) than in the corresponding control solvent group ($p = 0.033$; Fig. 3c). Although the overall percentage of larval abnormalities was higher with added clay and fluo exposure, no significant difference was observed with the solvent group (see ESM Table 1). The majority of abnormalities were spinal, recorded in 32.8 % of the contaminated larvae exposed to 15 % clay (see ESM Table 1). The corresponding PCA highlighted 69 % of variance in the four endpoints: larvae total length, heartbeats, hatching success and hatching time (Fig. 3d). The groups 0, 15 and 30 % of

Table 1 Measured PAH concentrations in spiked sediments ($N=1$)

Experiment	Sediment composition			PAH sediment concentration (µg g ⁻¹)							
	Grain size (mm)	Clay (% dw)	Peat (% dw)	Target concentration	Measured			Spiking efficiency (%)			
					Fluo	BaA	BaP				
Setting of sediment components											
1A	<0.2	—	—	0	nd		—				
				10	4.922		49				
	0.2–0.5	—	—	0	nd		—				
				10	2.538		25				
				0	nd		—				
1B	0.2–0.5	0	—	10	3.443		34				
				0	0.001		—				
	0.2–0.5	7.5	—	10	6.277		63				
				0	nd		—				
				10	11.033		110				
	0.2–0.5	15	—	0	0.008		—				
				10	10.511		105				
				0	0.009		—				
	1C	0.2–0.5	5	0	10	5.015		50			
					0	nd		—			
0.2–0.5		5	2.5	10	6.321		63				
				0	nd		—				
				10	5.912		59				
Sediment validation	0.2–0.5	5	5	0	nd		—				
				10	4.396		44				
				2A	0.2–0.5	5	2.5	0	nd		—
								3	1.890		63
								10	5.563		56
30	12.022		40								
2B	0.2–0.5	5	2.5	0	nd		—				
				10	6.728		67				
2C	0.2–0.5	5	2.5	0		nd	—				
				10		5.082	51				
2D	0.2–0.5	5	2.5	0			nd				
				10			1.736	18			

clay fluo and solvent treatment overlapped regarding axis 1 (40.3 %). The analysis did not reveal fluo and solvent treatment groups as being clearly independent for any clay concentration. Because a clay content of 7.5 % and above tends to clog embryos and reduce hatching rates, clay concentration for the artificial sediment was set at 5 %.

Since addition of organic matter to the sediment could putatively lead to increased microbial activity and oxygen depletion in the water column, the ERS medium was renewed daily just after dissolved oxygen concentration measurement at the water–sediment interface. In fact, oxygen saturation ranged between 97.1 and 109.3 % during embryo exposure

without the addition of peat. For 2.5 % peat, 87.5 % dissolved oxygen was measured at the beginning of the exposure, and this stabilised at around 100 % after 6 days. For sediments containing 5 % peat, dissolved oxygen varied between 74.4 and 106.9 %. Dissolved oxygen content in the water column decreased significantly with increasing peat concentration in the artificial sediment, but the mean values remained above 96.8 % for all treatments (ESM Fig. 1). The addition of peat did not significantly affect embryo–larval survival or development in the control solvent group (see ESM Table 2). Fluo spiking efficiency yielded 63 % for the no-peat sediment, 59 % for 2.5 % peat and 44 % for 5 % peat (Table 1). No

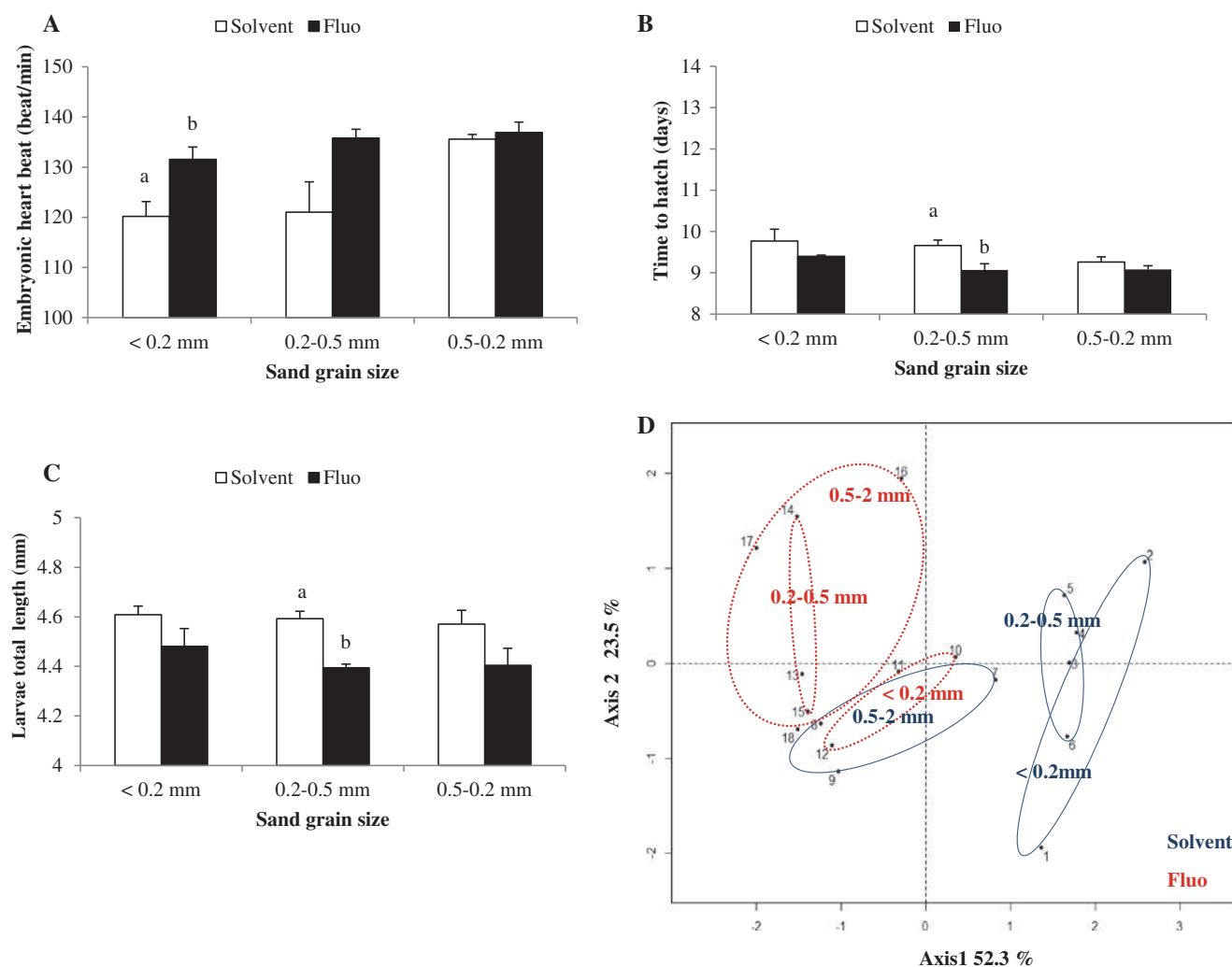


Fig. 2 How particles size affects fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae (experiment 1A). **a** Heartbeat measured at embryonic stage 7 dpf. **b** Time to hatch. **c** Total length of the larvae at hatching. Different letters stand for significant differences with solvent treatment (mean±SD, $N=3$; Student's t test, $p<0.05$). **d** Principal component

significant fluo-induced effect was observed regarding embryonic heartbeat, hatching rate, swim bladder inflation, or larva body and head lengths (see ESM Table 2). No significant fluo-induced effect on hatching time and yolk sac area was observed for 0 and 5 % peat sediment with or without fluo exposure (Fig. 4a, b and ESM Fig. 1). For 2.5 % peat sediment content, time to hatch was significantly delayed ($p=0.007$) and the yolk sac area reduced ($p=0.005$) following fluo exposure. Control larvae hatched at around 11 dpf, whilst fluo-exposed larvae hatched at 12.5 dpf. PAH-contaminated larvae showed yolk sac area 25 % smaller than in the solvent control larvae (Fig. 4a, b and ESM Fig. 1). Fluo induced abnormalities for all three sediment peat contents. Both the score and the percentage of abnormal individuals were increased by fluo exposure ($p=0.017$ and $p=0.016$; Fig. 4c and ESM Table 2 and Fig. 1). The fluo-spiked sediment with no peat induced the highest score, ten times higher than the no peat solvent-

analysis representing normalized coefficients on the first two axes for four endpoints (larvae total length, heartbeat, abnormality score and time to hatch). Different numbers refer to different replicates of treatment. Plain lines refer to solvent treatments and dotted lines to fluo treatments

spiked sediment. The majority of fluo-induced larval abnormalities were spinal curvature, craniofacial deformities and cardiovascular anomalies (ESM Table 2). Severe cardiovascular anomalies, such as heart abnormal position and blood circulation defects, were particularly noticeable for the “no-peat” condition, accounting for up to 23.4 % of contaminated larvae. For the different fluo treatments, spinal deformities represented between 8.9 and 33.7 % of contaminated larvae, whilst craniofacial abnormalities were recorded in 13.3–28.9 %. Oedemas were only observed in fluo-exposed larvae, but at a low frequency (2.2 %). Eye abnormalities were not observed. Average percentages of abnormal individuals were below 10 % for all three control sediments. PCA featured 85.7 % of four factor variances: hatching time, abnormality score, larvae length and yolk sac area (Fig. 4d). Solvent and fluo treatments for 5 % peat content overlapped along axis 1 (51.4 %). In contrast, fluo and solvent treatments for 2.5 %

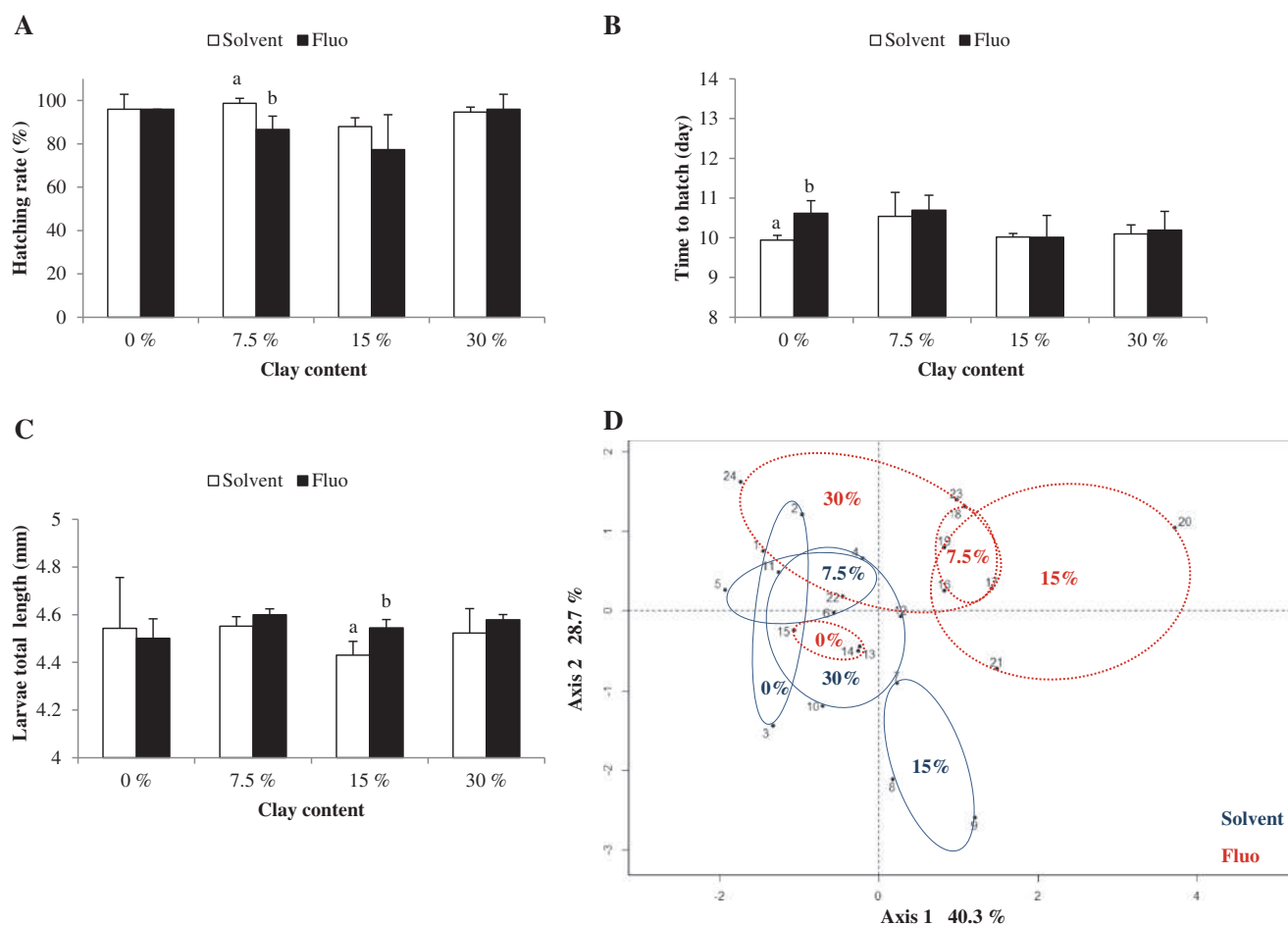


Fig. 3 How clay content affects fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae (experiment 1B). **a** Hatching rate. **b** Time to hatch. **c** Total length of the larvae at hatching. Different letters stand for significant differences with solvent treatment (mean \pm SD, $N=3$; Student's t test, $p<0.05$). **d** Principal component analysis representing normalized

coefficients on the first two axes for four endpoints (larvae total length, heartbeats, hatching rate and time to hatch). Different numbers refer to different replicates of treatment. Plain lines refer to solvent treatments and dotted lines to fluo treatments

peat content were clearly anti-correlated along axis 1. For 0 % peat content, fluo and solvent treatments were anti-correlated along axis 2, which represents only 34.3 % of variance. Therefore, the most suitable peat concentration for artificial sediment was set at 2.5 %.

Physicochemical composition of the artificial sediment

Particle sizes of the final composition of the artificial sediment ranged between 0.2 and 0.5 mm, with a median value of 0.271 mm (Table 2). The particulate organic carbon content was equivalent to 0.87 %. Dissolved ammonium in pore water reached on average 11.0 μM .

Effect of several fluo concentrations

Figure 5 presented the major significant effects observed in medaka early life stages exposed to three different fluo concentrations. A decrease in total larvae length for 30 $\mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$

fluo was reported, but this was not significantly different from the solvent larvae length (Fig. 5a). Larval abnormalities at hatching increased with increasing fluo concentration, but the only significant changes occurred with the highest tested concentration of fluo (Fig. 5b). Major abnormalities were spinal curvatures (Fig. 5c).

Validation of the artificial sediment: repeatability testing at a single fluo concentration

The control solvent and 10 $\mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$ fluo conditions were replicated three times with three different batches of sediment (experiments 1C, 2A and 2B). The results are summarized in Table 3. The fluo concentration in sediment from the three different experiences varied by 10 %, equivalent to an average of 6.068 $\mu\text{g g}^{-1}\text{dw}$ fluo. The coefficients of variation for acute toxicity endpoints—such as embryonic and larval survival and hatching rate—were low, ranging from 1 to 6 %. Biometry of larvae, including body and head lengths, varied by the same

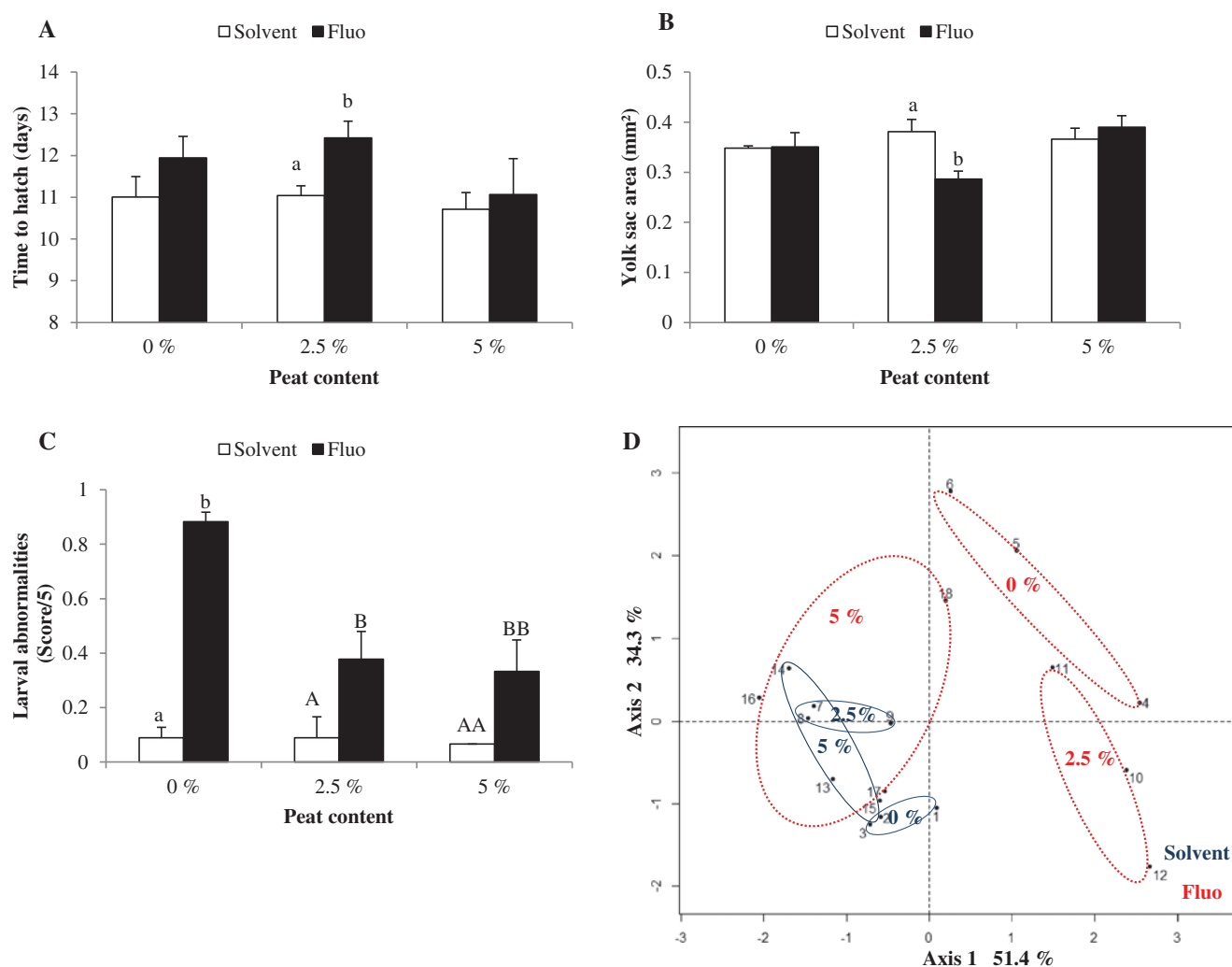


Fig. 4 Fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae for different peat sediment contents (experiment 1C). **a** Time to hatch. **b** Yolk sac area. **c** Larval abnormalities score at hatching. Different letters stand for significant differences with solvent treatment (mean±SD, $N=3$; Student's t test, $p<0.05$). **d** Principal component analysis representing normalized

coefficients on the first two axes for four end points (total larvae length, hatching rate, yolk sac area and larval abnormality score). Different numbers refer to different replicates of treatment. Plain lines refer to solvent treatments and dotted lines to fluo treatments

amount. Yolk sac area varied up to 10 % for solvent and 17 % for fluo treatment. In contrast, the coefficients of variation of larval abnormalities, including score and percentage, were higher, particularly for the solvent treatment. This feature results likely from variations of embryo quality from one experiment to another.

Validation of the artificial sediment: testing with additional PAH compounds

Spiking efficiency on artificial sediment yielded 50 and 18 %, respectively (Table 1). Neither of these two PAHs affected embryo or larval survival at the studied concentrations

Table 2 Physicochemical characteristics of the final artificial sediment ($N=3$)

$D(v,0.10)\mu\text{m}^a$	$D(v,0.50)\mu\text{m}$	$D(v,0.90)\mu\text{m}$	$<65\mu\text{m}(\%)$	POC (%)	$N(\mu\text{M})^b$
6.6 ± 0.2	270.9 ± 11.1	587.8 ± 8.8	30.6 ± 1.3	0.87 ± 0.10	11.0 ± 1.7

POC particulate organic carbon

^a Particle-size distribution

^b Dissolved ammonium

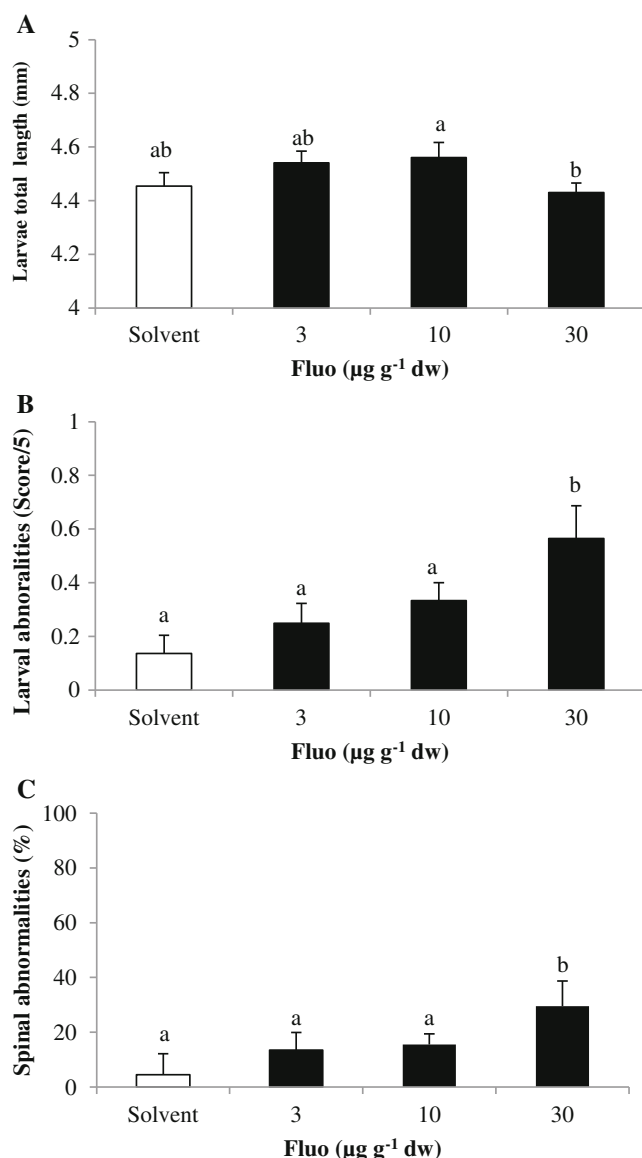


Fig. 5 Developmental effects on Japanese medaka exposed to different fluo concentrations (experiment 2A). **a** Total larvae length. **b** Larval abnormality score. **c** Spinal abnormalities. Different letters stand for significant differences within treatments (mean±SD, $N=3$; ANOVA, $p<0.05$)

(Table 4). BaA exposure significantly increased abnormalities in newly hatched larvae. The majority of BaA-induced abnormalities were spinal deformations and changes in jaw shape. BaP exposure did not induce teratogenicity, but significantly delayed hatching and increased yolk sac resorption.

Discussion

Selection of suitable component concentrations

The final composition of the artificial sediment was selected to enable maximal spiking efficiency, maximal pollutant toxicity and minimal toxicity of the non-spiked sediment matrix.

Neither embryonic nor larval mortality was observed at significant levels, whatever the treatment under consideration. Since only silica sand was used as a matrix to spike fluo for experiment 1A, spiking efficiencies did not exceed 50 % regardless of the grain size. However, fluo exposure induced significant adverse effects on embryo development, depending on sediment grain size. Although increased fluo sand concentration was observed with the <0.2-mm fraction, the effects of fluo on medaka embryos were more potent with the 0.2- to 0.5-mm fraction. We can suppose that fluo was more bioavailable for medaka embryos with this sand fraction. Therefore, the 0.2- to 0.5-mm grain size fraction was selected for the composition of the artificial sediment.

The addition of clay to the sediment in experiment 1B increased fluo spiking efficiency from 63 to 100 %. This is consistent with Fanget et al. (2002) who demonstrated efficient adsorption of pyrene, another four-ring PAH, to kaolin clay. They speculated that PAHs could form micro-crystals at the surface of the solid phase. In our study, when clay concentration reached 30 % dw, fewer fluo molecules adsorbed onto sediment particles. We can assume that accessibility of adsorption sites for fluo may be limited by the presence of an excess of clay. Despite efficient fluo adsorption onto clay particles, few toxic effects were observed for medaka embryos and larvae. We can thus assume that in the exposure conditions performed in our study, fluo was weakly available to medaka embryos.

In the third experiment (1C), it was shown that the addition of blond peat to the artificial sediment led to a reduction in the efficiency of fluo spiking. These results are again consistent with those of Fanget et al. (2002) who demonstrated that humic acids attach to the surface of clay particles, which in turn reduce PAH sorption to binding sites. Organic matter is an effective sorbent for hydrophobic compounds such as PAHs (Guasch et al. 2012). This is due to the high molecular weight and high sorption surface of the organic matter and the possibility of strong interactions through van der Waals bonds to hydrophobic pollutants (Guasch et al. 2012). The bioavailability of PAH molecules bound to organic matter is controlled through two major mechanisms—sorption and facilitation—depending on the exposure scenario (Mayer et al. 2007; Bittner et al. 2011). PAH sorption is mainly governed by humic substances that are flexible in shape in the presence of water and act as a trap for hydrophobic molecules (Laor et al. 1998; Fanget et al. 2002). Thereby dissolved organic matter and particulate organic matter in water reduce freely dissolved PAHs (Akkanen and Kukkonen 2003; Akkanen et al. 2012; Laor et al. 1998; Fanget et al. 2002). The reduced bioavailability might explain the lower toxicity of fluo for sediments containing 5 % peat compared to 2.5 % peat. Penetration of hydrophobic chemicals in living organisms is limited by the aqueous unstirred boundary layer between the organism and the water column (Kwon et al. 2006). This layer

Table 3 Repeatability of the exposures to fluo with three different batches of artificial sediment

	Solvent			CV (%)	Fluo			CV (%)
	Experiment 1C (batch 1)	Experiment 2A (batch 2)	Experiment 2B (batch 3)		Experiment 1C (batch 1)	Experiment 2A (batch 2)	Experiment 2B (batch 3)	
Fluo ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)					5.912	5.563	6.728	10
O ₂ (%)	101.7 \pm 0.5	94.3 \pm 1.2	90.6 \pm 3.0	6	93.1 \pm 1.1	91.8 \pm 1.7	92.2 \pm 1.4	1
Embryonic survival (%)	96.7 \pm 5.5	89.1 \pm 5.0	94.5 \pm 6.4	4	100.0 \pm 0.0	90.4 \pm 2.1	93.2 \pm 2.4	5
Larval survival (%)	98.4 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	1	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	98.6 \pm 2.4	1
Hatching rate (%)	89.2 \pm 2.5	89.2 \pm 2.5	93.2 \pm 4.9	3	87.0 \pm 6.6	87.7 \pm 3.8	91.8 \pm 4.3	3
Time to hatch (day)	11.0 \pm 0.2	11.8 \pm 0.2	12.2 \pm 0.2	5	12.4 \pm 0.4	12.1 \pm 1.1	11.6 \pm 0.4	3
Larvae total length (mm)	4.5 \pm 0.0	4.5 \pm 0.0	4.6 \pm 0.0	1	4.5 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	1
Larvae head length (mm)	0.92 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02	0.87 \pm 0.01	5	0.93 \pm 0.03	0.87 \pm 0.04	0.83 \pm 0.02	6
Yolk sac area (mm ²)	0.38 \pm 0.02	0.45 \pm 0.04	0.38 \pm 0.01	10	0.29 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02	0.41 \pm 0.02	17
Score of abnormalities (/5)	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	56	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	9
Abnormal larvae (%)	8.9 \pm 7.7	9.0 \pm 3.7	13.3 \pm 0.0	24	28.9 \pm 3.8	24.4 \pm 7.7	29.7 \pm 5.2	10

Sediment (0.2–0.5 mm sand, 5 % dw clay and 2.5 % peat) was spiked with 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw fluo. (mean \pm SD, $N=3$)

CV coefficient of variation

acts as an efficient barrier for the diffusive transfer of most hydrophobic chemicals to living organisms. However, facilitation of transport in the presence of dissolved organic matter was also recently demonstrated (Mayer et al. 2007; Bittner

et al. 2011; ter Laak et al. 2009). Dissolved organic matter can change the water solubility of PAHs (Döring and Marschner 1998; Laor et al. 1998). At high concentrations of dissolved humic substances, diffusive conductivity is increased, resulting in an increased uptake of pollutants by organisms (Döring and Marschner 1998; Laor et al. 1998). This may enhance transportation by associating with the toxic compound, its diffusion and its release into the organisms.

In conclusion, hydrophobic pollutants are able to accumulate in sediments by binding to silicates, clay and organic matter. Organic pollutants are trapped in complex structures of organic matter, whilst binding interactions with clay and silicates may be more sustainable. Consequently, the organic matter content of sediment is thought to be one of the main factors driving hydrophobic pollutant availability. In addition, the daily ERS renewal performed to stabilise dissolved oxygen above 80 % (OECD 1992) led to moderate sediment particle resuspension during the exposure. This process could increase PAH desorption and consequently improve PAH bioavailability. Differences of toxicity reported in this study likely depend on the partitioning of pollutants between the water column and the sediment, as well as differences in spiking efficiencies.

Validation of the final composition for our artificial sediment

Repetition of fluo exposure revealed slight differences in the development of the control individual, which could be explained by two factors: variability in sediment and egg batches. Since the spiking efficiency of the three fractions tested was comparable, the major variability observed may be due to differences in egg batch quality. Variability in egg

Table 4 Developmental effects of BaP- and BaA-spiked sediments on medaka embryos and larvae (experiments 2C and 2D) in comparison to Fluo exposures (experiments 1C, 2A and 2B)

Endpoints	Experiments 1C, 2A and 2B (fluo exposure)	Experiment 2C (BaA exposure)	Experiment 2D (BaP exposure)
Embryonic mortality	1.0	1.1	1.0
Larval survival	1.0	1.0	1.0
Hatching rate	1.0	1.1	1.0
Time to hatch	1.0	1.0	1.1 ^a
Larval total length	1.0	1.0	1.1
Larval head length	1.0	1.0	1.1
Yolk sac area	0.9	0.9	0.8 ^a
Non-inflated swim bladder	0.9	1.5	2.3
Abnormal larvae	2.1 ^a	6.5 ^a	2.5
Abnormalities			
Oedema	0.5	-	-
Spinal	1.8	7.0 ^a	1.3
Craniofacial	3.6 ^a	17.8 ^a	7.0
Eye	1.0	3.0	–
Cardiovascular	2.2	4.0	–

Values from experiments 1C, 2A and 2B were averaged. Results are expressed as induction factor relative to the respective solvent control for purpose of comparison among the experiments

^a Statistical differences with the control solvent ($N=3$; Student's t test, $p<0.05$)

quality may lead to differences in embryonic and larval survival, hatching success, larvae abnormalities, time to hatch and biometry. The coefficients of variation were acceptable, equivalent on average to 1–10 %, except for larval abnormalities in the control solvent. Exposition to the artificial sediment can therefore be considered reproducible if the eggs are of high quality.

A dose-dependent increase in developmental defects (mainly larval abnormalities and reduction of body length) was observed following medaka embryo exposure to fluo-spiked sediment. Exposure to BaA- and BaP-spiked sediments also led to adverse effects on medaka embryo development. BaP was shown to delay hatching, but had low teratogenic effects in medaka embryos. In contrast, BaA as well as fluo had no effect on the kinetic of embryonic development, but conversely induced a high level of larval abnormalities. Our findings support those of Incardona et al. for PAH embryotoxicity (Incardona et al. 2004, 2005, 2006, 2011). In our study, fluo induced more severe cardiovascular abnormalities than BaP, such as abnormal heart location and blood circulation defects. After waterborne exposure of zebrafish larvae to fluo, but not to BaP, Matson et al. (2008) observed increased prevalence of cardiac, peri-cardiac dysfunctions and severe lordosis. BaP bioavailability may be limited by its weak solubility and high molecular weight. It can also be hypothesised that the size of the molecule may limit its penetration through the chorion. BaA, known as a strong AhR agonist (Incardona et al. 2006; Barron et al. 2004), was shown in the present study to induce developmental abnormalities such as lordosis, scoliosis and craniofacial deformities, but no significant cardiac dysfunction. BaP is also an AhR agonist (Incardona et al. 2011), but appeared in our study to be less teratogenic than BaA or fluo. This can be partly explained by the higher soil–water partition coefficient of BaP ($\log K_{oc} = 5.7\text{--}6.7$), leading to stronger adsorption to sediment particles than fluo ($\log K_{oc} = 4.6\text{--}4.7$) or BaA ($\log K_{oc} = 5.3$; Sverdrup et al. 2002; ATSDR 1995). In our bioassay conditions, fluo or BaA molecules were certainly more bioavailable than BaP for Japanese medaka embryos, resulting in higher exposure and toxicity levels. Our results suggest that PAH toxicity in Japanese medaka early life stages was related to the physico-chemical properties of the compounds tested. It was shown herein that increasing the $\log K_{oc}$ results in decreasing PAH embryotoxicity.

Conclusion

The final sediment composition includes 92.5 % dw of 0.2–0.5 mm silica, 5 % dw clay and 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat. This artificial matrix is suitable for medaka embryo development and allows relatively high and reproducible sorption of PAHs of different molecular weights and

hydrophobicity. The developmental toxicity of moderate concentrations of three different PAHs was evidenced using this artificial sediment and the MELAc test. To fully validate this new artificial matrix, other hydrophobic organic pollutants and complex pollutant mixtures should be tested.

Acknowledgments This study was funded by the French National Agency for Research, program “Contaminant, Ecosystème et Santé”, as part of the ConPhyPoP (2009-002) research project. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence for continental and coastal ecosystems. Florane Le Bihan received a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Prescilla Perrichon received a PhD fellowship from the Conseil Général de Charente Maritime and Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer. The authors wish to thank Steffen Keiter and Hanno Zielke for their discussion on sediment preparation and the Sibelco Company for generously providing sand. The authors would like to thank reviewers for the deep and accurate revision of their manuscript.

References

- Akkanen J, Kukkonen JVK (2003) Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem* 22(3):518–524
- Akkanen J, Tuikka A, Kukkonen JVK (2012) On the borderline of dissolved and particulate organic matter: partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 78:91–98
- ATSDR (1995) Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA
- Barjhoux I, Baudrimont M, Morin B, Landi L, Gonzalez P, Cachot J (2012) Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol Environ Saf* 79:272–282
- Barron MG, Heintz R, Rice SD (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res* 58(2–5):95–100
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P (1998) PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar Pollut Bull* 36(8):577–586
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar Environ Res* 47(5):415–439
- Belanger SE, Balon EK, Rawlings JM (2010) Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat Toxicol* 97(2):88–95
- Benlahcen KT, Chaoui A, Budzinski H, Bellocq J, Garrigues P (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Mar Pollut Bull* 34(5):298–305
- Bittner M, Macikova P, Giesy JP, Hilscherova K (2011) Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environ Int* 37(5):960–964
- Bouloubassi I, Méjanelle L, Pete R, Fillaux J, Lorre A, Point V (2006) PAH transport by sinking particles in the open Mediterranean Sea: a 1 year sediment trap study. *Mar Pollut Bull* 52(5):560–571
- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, Le Menach K, Garrigues P (2000) Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J Anal Chem* 367(2):165–171
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257–267
- Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environ Sci Technol* 41(22):7830–7836
- Cachot J, Minier C, Law M, Didier PC, Schleis J, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2008) The use of embryos of the Lambda *cII* transgenic medaka to assess short and long term effects of sediment-sorbed pollutants: application to sediments of the Seine estuary (Normandy, France). *Mar Environ Res* 66(1): 65–65
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Souissi S, Lardy S, Augagneur S, Budzinski H (2007) Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: alkylphenol–polyethoxylates. *Chemosphere* 70(2): 281–287
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Peluhet L, LeMenach K, Souissi S, Budzinski H (2009) Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ Pollut* 157(1):64–71
- Döring UM, Marschner B (1998) Water solubility enhancement of benzo(a)pyrene and 2,2',5,5'-terachlorobiphenyl by dissolved organic matter (DOM). *Phys Chem Earth* 23(2):193–197
- EC (2006) Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the council concerning the registration, evaluation and authorization of chemicals (REACH). *Off J Eur Union* vol L 396
- EC (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J Eur Union* vol L276
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97(2):79–87
- Etcheber H, Relexans J-C, Beliard M, Weber O, Buscail R, Heussner S (1999) Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep-Sea Res II Top Stud Oceanogr* 46(10):2249–2288
- Fanget B, Devos O, Naffrechoux E (2002) Pyrene transfer from clay particles to water: the role of humic acid. *Rev Sci Eau* 15:95–108
- Farwell A, Nero V, Croft M, Bal P, Dixon DG (2006) Modified Japanese medaka embryo–larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch Environ Contam Toxicol* 51(4):600–607
- Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A, Akkanen J, Slootweg T, Mäenpää K, Leppänen M, Agbo S, Gallampois C, Kukkonen JK (2012) Bioavailability of organic contaminants in freshwater environments. In: Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A (Eds), *Emerging and priority pollutants in rivers. The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin, pp 25–53
- Harris JRW, Cleary JJ, Valkirs AO (1996) Particle–water partitioning and the role of sediments as a sink and secondary source of TBT. In: Champ MA, Seligman PF (eds) *Organotin*. Springer, the Netherlands, pp 459–473
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Soils Sediments* 3(3):197–207
- Hornung MW, Cook PM, Flynn KM, Lothenbach DB, Johnson RD, Nichols JW (2004) Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. *Aquat Toxicol* 67(1):1–11
- Höss S, Ahlf W, Fahnenstich C, Gilberg D, Hollert H, Melbye K, Meller M, Hammers-Wirtz M, Heininger P, Neumann-Hensel H, Ottermanns R, Ratte HT, Seiler TB, Spira D, Weber J, Feiler U (2010) Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination—determination of toxicity thresholds. *Environ Pollut* 158(9):2999–3010
- Hsu P, Matthäi A, Heise S, Ahlf W (2007) Seasonal variation of sediment toxicity in the Rivers Dommel and Elbe. *Environ Pollut* 148(3):817–823
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196(2): 191–205
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK, Scholz NL (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspect* 113(12):1755–1762
- Incardona JP, Day HL, Collier TK, Scholz NL (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(3):308–321
- Incardona JP, Linbo TL, Scholz NL (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol Appl Pharmacol* 257(2):242–249
- Iwamatsu T (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121(7–8):605–618
- Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2006) A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem* 25(8):2097–2106. doi:10.1897/05-460r.1
- Kwon JH, Katz LE, Liljestrand HM (2006) Use of a parallel artificial membrane system to evaluate passive absorption and elimination in small fish. *Environ Toxicol Chem* 25:3083–3092
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149(2):196–209
- Laor Y, Farmer WJ, Aochi Y, Strom PF (1998) Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. *Water Res* 32(6):1923–1931
- Matson CW, Timme-Laragy AR, Di Giulio RT (2008) Fluoranthene, but not benzo(a)pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74(1): 149–154
- Mayer P, Fernqvist MM, Christensen PS, Karlson U, Trapp S (2007) Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environ Sci Technol* 41(17):6148–6155
- McElroy AE, Bogler A, Weisbaum D, Norris M, Mendelman LV, Setlow R, Winn R (2006) Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo(a)pyrene dosed sediments. *Mar Environ Res* 62(Supplement 1):S273–S277
- Nia Y, Garnier JM, Rigaud S, Hanna K, Ciffroy P (2011) Mobility of Cd and Cu in formulated sediments coated with iron hydroxides and/or humic acids: a DGT and DGT-PROFS modeling approach. *Chemosphere* 85(9):1496–1504
- NIST (2008) Certificate of analysis for standard reference material (SRM)1944 New York/New Jersey waterway sediment. National institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg (22 December 2008)

- OECD (1992) Guidelines for the testing of chemicals fish early life stage toxicity test, test no. 210. Section 2: effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development
- OECD (2004) Guidelines for the testing of chemicals sediment–water chironomid toxicity test using spiked sediment, test no. 218. Section 2: effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development
- Roberts DA (2012) Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. *Environ Int* 40: 230–243
- Rocha PS, Bernecker C, Strecker R, Mariani CF, Pompêo MLM, Storch V, Hollert H, Braunbeck T (2011) Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicol Environ Saf* 74(7):1951–1959
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis, vol 167. Fisheries Research Board of Canada Bulletin
- Sundberg H, Hanson M, Liewenborg B, Zebühr Y, Broman D, Balk L (2007) Dredging associated effects: maternally transferred pollutants and DNA adducts in feral fish. *Environ Sci Technol* 41(8): 2972–2977
- Sverdrup LE, Nielsen T, Henning Krogh P (2002) Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environ Sci Technol* 36:2429–2435
- ter Laak TL, ter Bekke MA, Hermens JLM (2009) Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms. *Environ Sci Technol* 43(19):7212–7217
- Vicquelin L, Leray-Forget J, Peluhet L, LeMenach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat Toxicol* 105(3–4): 235–245
- Wölz J, Engwall M, Maletz S, Olsman Takner H, van Bavel B, Kammann U, Klempt M, Weber R, Braunbeck T, Hollert H (2008) Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine—a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environ Sci Pollut Res* 15(7):536–553
- Zielke H (2011) Time-related alterations and other confounding factors in direct sediment contact tests. RWTH Aachen

2.2.4 Article n°2: Comparaison de sensibilité des tests embryo-larvaires médaka et poisson zèbre

L'un des objectifs du projet de recherche ConPhyPoP était de mettre au point des tests embryo-larvaires adaptés aux composés hydrophobes sur différents modèles. Le médaka japonais, la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre ont été sélectionnés pour ce projet de recherche pour leur forte sensibilité aux contaminants. Leur biologies et leurs génomes sont largement documentés, de plus ces trois espèces sont recommandées par l'OCDE. Ces espèces apparaissent complémentaires pour cette étude, leurs différences de développement pouvant conduire à des différences de sensibilité aux contaminants.

Ainsi la composition du sédiment artificiel a été mise au point parallèlement sur le médaka japonais (article n°1) et sur le poisson zèbre. Chacune des expériences présentées dans les sections précédentes sur la mise au point du sédiment artificiel ont aussi été réalisées sur le poisson zèbre avec les mêmes sédiments d'exposition. L'article n°2 compare les différences de réponses obtenues entre les deux poissons modèles. L'utilisation du poisson zèbre pour des études de toxicité permet de nombreux avantages semblables au médaka japonais excepté le temps de développement. En effet les embryons de poisson zèbre éclosent après 48 à 72 h à 28 °C tandis que les embryons de médaka japonais éclosent après 9 à 11 jours à 26 °C. Ces deux espèces sont couramment utilisées pour l'évaluation de la toxicité de sédiment. Les objectifs de cette étude étaient doubles. Dans un premier temps l'effet de différentes concentrations de tourbe sur la biodisponibilité du BaP et du Fluo a été détaillé pour le poisson zèbre. La toxicité des deux HAP a été évaluée à l'aide de différents paramètres létaux et sublétaux à savoir survie, succès d'éclosion, malformations, test de locomotion, et EROD. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus sur le médaka japonais de l'article n°1.

Tout comme l'avait révélé le MELAc, ce travail a suggéré que la biodisponibilité du Fluo et du BaP était diminuée par l'augmentation de la teneur en tourbe dans le sédiment. Contrairement au médaka, le BaP n'a pas induit d'effet sur la survie ou le développement des embryons de poisson zèbre. En revanche, le Fluo a induit des effets délétères sur le développement des poissons zèbre : mortalité, diminution du succès d'éclosion et augmentation du temps de développement et de la taille des larves à l'éclosion. De plus, la mesure de l'activité EROD a révélé une induction marquée pour les larves de poisson zèbre exposées au BaP en absence de tourbe.

Les tests de locomotion ont exhibé des réponses similaires pour les deux espèces. L'exposition au Fluo a diminué la réponse des larves de poisson zèbre et de médaka japonais face au stress lumineux. Les larves de médaka japonais ont également présenté une réduction de leur activité natatoire après exposition au BaP.

La toxicité des deux HAP étudiés a été associée à leur hydrophobicité. Le BaP avec un coefficient log K_{oc} plus important que le Fluo a induit moins d'effets toxiques. En absence de tourbe, le Fluo pourrait avoir été plus labile et plus disponible pour les embryons. A la concentration de 2.5 % de tourbe dans le sédiment, très peu d'effets des contaminants ont été observés sur le poisson zèbre. A l'inverse, cette teneur en tourbe était la plus adéquate pour le MELAc. Le MELAc est apparu plus sensible que le test embryo-larvaire sur poisson zèbre pour révéler les effets toxiques du BaP et du Fluo. Cela pourrait s'expliquer principalement par une sensibilité plus importante du médaka envers les HAPs, et un temps d'exposition plus long.

Ce travail a complété la mise au point et la validation de la composition du sédiment artificiel. Les deux tests embryo-larvaires sur des espèces présentant des physiologies proches ont révélé des différences de sensibilité aux contaminants hydrophobes. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences de phylogénie, stade de développement et capacité

d'adsorption et de métabolisation. Pour l'évaluation des effets tératogènes et embryotoxiques, il est essentiel de connaître la sensibilité des espèces pour les contaminants considérés. Le médaka japonais est apparu plus adapté à l'évaluation de la toxicité de HAP. Dans le cadre d'une évaluation des risques liés à une substance, il semblerait judicieux de considérer différentes espèces de poissons recommandées par l'OCDE afin d'éviter une évaluation erronée.

ARTICLE II

Perrichon P, Le Bihanic F, Bustamente P, Budzinski H, Cachot J, Cousin X, Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact assay. Environ Sci Pollut Res ***en révision***.

Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact assay

Prescilla Perrichon^{a,b,*}, Florane Le Bihanic^c, Paco Bustamante^b, Karyn Le Menach^c, Hélène Budzinski^c, Jérôme Cachot^c and Xavier Cousin^{a, d}

^a Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

^b Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), CNRS-Université de La Rochelle, UMRi 7266, 2 rue Olympe de Gouges, 17042 La Rochelle Cedex 01, France

^c Université de Bordeaux (EPOC, UMR CNRS 5805), avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

^d INRA, LPGP, Campus Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

Abstract

Due to hydrophobic and persistent properties, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have a high capacity to accumulate in sediments. Sediment quality criteria, for the assessment of habitat quality and risk for aquatic life, include understanding the fate and effects of PAHs. Sediment contact assays, using zebrafish embryos and larvae, are potential alternatives to animal toxicity testing. In the context of European regulation (REACH and Water Framework Directive), a new reference exposure protocol using artificial sediment was established to standardize toxicity testing and to limit natural sediment composition variability. The first objective was to apply a sediment contact exposure protocol using artificial sediment for zebrafish embryo-larval assay in order to validate a standard procedure for fish species that might be proposed in a new OECD guideline for chemicals testing. This procedure was validated through toxicity assessment of two models PAH, benzo[a]pyrene and fluoranthene. A comparative study of toxicity responses from this exposure protocol was then performed using another OECD species, the Japanese medaka. The potential toxicity of both PAHs was assessed through lethal and sublethal endpoints (e.g. survival, hatching success, abnormalities, PMR and EROD) measured at different developmental stages, adapted to the embryonic development time of both species. Regarding effects observed for both species, a suitable artificial sediment composition for PAH toxicity testing was set at 92.5 % dw silica of 0.2-0.5 mm grain size, 5 % dw kaolin clay and 2.5 % dw blond peat only for Japanese medaka. PAH bioavailability and toxicity were highly dependent on the fraction of organic matter in sediment and of the K_{ow} coefficients of the tested compounds. Japanese medaka embryos appeared more robust than zebrafish embryos for understanding the toxicity of PAHs due to the longer exposure duration.

Keywords: Fish embryo-larval assay, PAHs, artificial sediment, EROD, behavioral performance, teratogenicity.

Abbreviations: AhR: Aryl hydrocarbon Receptor; PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; BaP: Benzo[a]pyrene; Fluo: Fluoranthene; hpf: hours post-fertilization; dpf: days post-fertilization; EROD: Ethoxyresorufin-*O*-deethylase; PMR: PhotoMotor Response.

*Corresponding author (present address). P. Perrichon, UMRi 7266 LIENSs, Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17042 La Rochelle Cedex 01, France. Tel.: +33 5 46 50 76 32. Fax: +33 5 46 50 76 63.

prescilla.perrichon@hotmail.fr

1. Introduction

The aquatic environment continuously receives anthropogenic pollutants which impact the habitat quality of these ecosystems and can represent an important threat for aquatic life. Natural phenomena – tides, storms and bioturbation - (Hollert et al. 2000) and anthropogenic activities – trawling, dredging and wake waves - (Köthe 2003) can release sediment-linked pollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) into the water column, leading to acute exposure of aquatic organisms. PAHs constitute an important part of pervasive compounds and their emission is increasing with the development of human activities (van der Oost et al. 2003; Shen et al. 2013). The PAH persistence, behavior and distribution in the environment are mediated by their physico-chemical properties (aromaticity and molecular weight). Indeed, the presence of a high number of aromatic rings (=PAH of high molecular weight) dictates their strong hydrophobicity, while their solubility and volatility are reduced (Dabestani and Ivanov 1999). Due to these hydrophobic properties, most PAHs have a high capacity to adsorb on particles and favor their accumulation in sediments which can result in high PAH concentrations in aquatic ecosystems. Therefore, sediments represent a major source of contamination, causing a threat to organisms for which they are habitat and a food source (Ahlf et al. 2002; Wölz et al. 2009). Therefore, toxicity assessment of the PAHs is necessary to determine sediment quality values in order to assess their impact on aquatic life.

Fish are an indispensable component of environmental quality assessments due to the diversity of life histories and habitat requirements, their position in aquatic food chains and the range of stress responses exhibited across species (Gilliers et al. 2006; Amara et al. 2007; Kerambrun et al. 2012). The use of fish in toxicity testing strategies has significantly increased in recent years due to their sensitivity to pollutants (Di Giulio and Hinton 2008; Padilla et al. 2009). However, the extensive use of test animals raises ethical questions. In application of the 3Rs principle (Replace, Reduce and Refine), established by Russell and Burch (1959), and the REACH regulation (Registration, Evaluation, Authorization & restriction of Chemicals) (Hengstler et al. 2006; Van der Jagt et al. 2004), methods need to be developed to reduce the number of organisms used (Belanger et al. 2010; Embry et al. 2010; Lammer et al. 2009; Strähle et al. 2012). Taking into consideration the regulatory policy of animal welfare, the last thirty years have seen the development of *in vitro* ecotoxicity assays and moves to promote testing of primary cell cultures or fish cell lines. Although these assays are fast, reduce the equipment requirement and limit the use of live animals, they are not completely transposable to the natural environment quality assessment. These assays can lead

to a high variability of responses depending on the physiological status of donor fish and/or the preparation quality of the procedure (Castaño et al. 2003). The use of fish embryo-larval stages - as an experimental model - is one of the alternative methods proposed for chemical testing. Early developmental stage assays (from the embryonic stage until the onset of exogenous feeding) are also considered as *in vivo* tests, and are therefore not covered by the EU directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). Acute toxicity tests with fish early life stages have been significantly developed in order to assess the potential risk of sediment pollution on the aquatic environment; sediment contact tests with fish early life stages are relevant tools to evaluate the bioaccumulation and toxicity of these pollutants (Bartzke et al. 2010; Feiler et al. 2013; Hollert et al. 2003; Kosmehl et al. 2007). Indeed, fish embryos and larvae are particularly vulnerable to the adverse effects of the organic pollutants, which impact their growth, development, physiology and behavior (Incardona et al. 2004; Lammer et al. 2009; Muhling et al. 2012; Scott et al. 2011) and over time fish survival and future generations renewal decrease dramatically (Heintz et al. 2000; Muhling et al. 2012).

Five main species have been recommended for chemical risk assessment: bluegill (*Lepomis macrochirus*), fathead minnow (*Pimephales promelas*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) (Lammer et al., 2009; OECD 2013a; 1998). In the present study, zebrafish and Japanese medaka were selected as experimental models. The use of zebrafish for toxicity testing offers multiple benefits (Hill et al. 2005; Spitsbergen and Kent 2003). First, they are easily bred in the laboratory and eggs are available in high numbers throughout the year. Moreover, transparency of both chorion and larvae allow at monitoring the morphological defects and at following all stages of development during exposure, which are well described and illustrated in the literature (Kimmel et al. 1995). Finally, zebrafish have a short embryonic development time (hatching between 48 and 72 hours post-fertilization (hpf) at 28 °C). Japanese medaka offer similar advantages to zebrafish embryos, except that the embryonic development time is longer (10 to 11 days post-fertilization (dpf) at 26 °C). This difference in development time means that medaka have an exposure duration which is longer than zebrafish. Zebrafish and medaka are now used extensively for sediment toxicity testing and several previous studies demonstrated that these species are suitable (Braunbeck et al. 2005; Farwell et al. 2006; Hollert et al. 2003; Höss et al. 2010; Kosmehl et al. 2006; Vicquelin et al. 2011). However, the toxic effects of PAHs are not easily transposable from one study to another due to the natural sediment composition variability (seasonal variability, sampling field, experimental variability), which play a fundamental role in the bioavailability of compounds. To cope with such problems, the use of artificial sediment provides some benefits compared to natural sediment and could be a possible solution to standardize sediment exposure protocols: i) absence of background contamination, ii) well-characterized composition, iii) reproducible composition of sediment over time, and iv) absence of indigenous biota (Burton 2002). In fact, one artificial sediment composition was standardized by the test guideline 218 of OECD (OECD 2004) for the toxicity test using freshwater dipteran *Chironomus* sp.. However, its composition is not suitable for fish embryo-larval assays because it contains a high clay concentration (20% dw) which may cause serious problems of egg clogging by fine particles, reducing oxygen exchange and optimal embryos development.

In this general context, the aim of the present study was to apply a sediment contact exposure protocol in zebrafish, using an artificial sediment reference proposed for the 14-day medaka embryo-larval assays (Le Bihanic et al., in press), in order to validate a standard composition of the sediment for several fish species. This artificial sediment might then be proposed as part of a new OECD guideline for the testing of chemicals. To this end, BaP and Fluo were

selected as prototypic hydrophobic molecules because of their characteristics. Indeed, they are hydrophobic compounds and have high adsorption capacities on particles and organic matter. In addition, they are listed as priority substances by the European Water Framework Directive 2000/60/EC (EC 2000). Exposures were performed using a procedure adapted from Le Bihanic et al. (in press) for the 10-day embryo-larval toxicity assay (including 96 hours of exposure, embryos and pro-larvae) with zebrafish (OECD 2013b; 1998). Toxic responses of exposed-embryos and larvae (from the newly fertilized egg to the end of the sac-fry stages) to both of these PAHs were examined through individual, morphological and behavioral endpoints during and post-exposure, for different sediment compositions. In addition, the induction of cytochrome P450 of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) agonist PAH was measured by the level of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish. The second step consisted in the comparison of the response sensitivity (threshold and intensity) of zebrafish (96-120 hpf) and Japanese medaka (10-14 dpf) embryos and larvae, using results from this study and previously published research (Le Bihanic et al., in press).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8), fluoranthene (CAS No. 206-44-0) and benzocaine (CAS No. 94-09-7) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Spiking PAH solutions were made in isooctane (CAS No. 540-84-1, HPLC grade, Scharlau Barcelona, Spain) at 750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. PAH spiked-sediment and chemical analysis were performed with dichloromethane (CAS No. 75-09-2) solvent from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands) and Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium).

2.2. Preparation of spiked artificial sediment

The artificial sediment was prepared according to Le Bihanic et al. (in press). The reconstituted sediment was composed of sand measuring 0.2-0.5 mm (sieved from sand BB 0.2/2 h, Mios, France), 5 % kaolin clay (Merck, Darmstadt, Germany) and *Sphagnum* blond peat (Florentaise, St Mars du Désert, France). Three concentrations of peat (0, 2.5 and 5 %) were also used to evaluate their suitability for the zebrafish embryo-larval assay. Briefly, peat was dried 48 h and sieved (0.5 mm). Milli-Q water was added to the peat (12:1, v/v) in glass bottles and shaken for 48 h at 180 rpm at room temperature. Sand and 5 % kaolin clay were then mixed to humid peat, and shaken for 24 h. pH was adjusted to 6.5 with 10 % CaCO_3 solution. After seven days of stabilization (at room temperature) 1:4 v/v of milli-Q water was added to the sediment. After a 24 h equilibration period, supernatant water was removed and the sediment was dried at 105 °C for 14 h. After cooling, the artificial sediment was spiked with two PAHs, BaP ($\text{Log } K_{\text{ow}} = 6.04$) and Fluo ($\text{Log } K_{\text{ow}} = 5.16$) at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw sediment each, equivalent to 20-fold the environmental concentration based on the concentration measured in sediments from the upper Seine estuary (France) (Cachot et al. 2006). 60 mL of dichloromethane and PAH solution were mixed to 30 g of sediment in a 250 mL round-bottom glass flask. Then, solvent was evaporated with a rotary evaporator Rotavapor (IKA, Staufen, Germany) for 60 min (115 rpm, 45 °C). The spiked sediment was stored overnight in

the dark at room temperature under a fume hood to ensure complete residual solvent elimination. A solvent control sediment (dichloromethane without PAH) was prepared in the same manner. An aliquot (5 g) of each spiked sediment was sampled for PAH chemical analysis.

2.3. PAH chemical analysis of artificial sediment

Sediment samples were stored at -20 °C before analysis. Fluoranthene-d10 and benzo[a]pyrene-d12 were used as internal standards for the quantification of PAHs. Briefly, organic compounds were extracted from 0.2 g of sediment using a microwave (10 min at 30 W) with dichloromethane (solvent) (Budzinski et al. 2000). Samples were then concentrated into 300 µL of isooctane using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap Labconco, Kansas city, USA). Extracts were purified and fractionated on alumina and silica micro-columns, following the procedure described by Behar et al. (1989). Finally, these extracts were concentrated once more in isooctane and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) as described by Baumard et al. (1998). Extraction efficiencies were equivalent on average to 84 %.

2.4. Zebrafish embryo-larval assays

Maintenance and egg production of zebrafish: wild type TU strain (Tübingen, Germany) zebrafish (*Danio rerio*) were maintained in communities in 10 L tanks under standard conditions in water obtained after a mix of reverse osmosis treated water and tap water, both being filtered beforehand with dust and charcoal filters, to obtain a pH of 7.5 ± 0.5 and a conductivity of $300 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Racks aeration allowed an oxygen saturation $\geq 80 \%$. Water and room temperature were kept between 26 and 28 °C with a 14 h light/10 h dark photoperiod. Ammonia, nitrite and nitrate were monitored daily for 2 months then weekly and remained within recommended ranges (Lawrence 2007). The fish were fed twice a day with commercial granulates (INICIO Plus 0.5, BioMar, France) and an additional distribution of *Artemias* sp. nauplii (INVE, Belgium), occasionally supplemented with red sludge worms (Boschetto-Frozen fish food). Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish. One adult male and one female were placed together in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany) the evening before eggs were required. Spawning and fertilization took place within 30 min after the onset of light in the morning.

Zebrafish exposure (Fig. 1 Supplementary data): Fertilized and normally developed eggs were selected at 8-cell stage (1h15 post-fertilization) using a dissecting microscope. The egg fertilization rate had to be $\geq 70 \%$ and a mix of five spawns was used to avoid a potential spawn effect. Artificial water (E3) according to ISO 7346/3 (1996) was used as test medium (0.33 mM CaCl_2 , 0.33 mM MgSO_4 , 5 mM NaCl and 0.17 mM KCl). Exposure tests were carried out in plastic Petri dish (35 mm diameter) with 3 g dw artificial sediment and 3 mL artificial water in triplicates as reported by Daouk (2011) and Vicquelin et al. (2011). 30 embryos were placed on a 1 mm thermoformed Nytex® grid to avoid being buried in the sediment, and exposed for 96 hours in incubator at $28 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, with the same photoperiod as

the rearing room. During exposure, Petri dishes were covered with a lid in order to prevent evaporation. At the end of exposure, larvae were transferred to new Petri dishes containing only E3 medium until 10 dpf for analysis. Larvae were not fed during the experiment.

Survival and hatching success: Embryonic and larvae survival were recorded daily until 10 dpf. Dead individuals were removed. The survival rate (SR) was estimated as: $SR = 100 (SNt_x / SNt_0)$, where SNt_x and SNt_0 are the number of live individuals at times t_x (time of the measure, hpf) and t_0 (beginning of the experiment, 0 hpf). Similarly, hatched individuals were counted between 48 and 72 hpf. At the end of exposure (96 hpf), hatching success (HS) was calculated as: $HS = 100 (HIt_{96h} / SNt_{96h})$, where HIt_{96h} is the number of hatched and living larvae. SR and HS were expressed as percentages.

Biometric measurements and abnormalities monitoring: At the end of exposure (96 hpf), 15 larvae per replicate (45 per treatment) were anesthetized with benzocaine ($16 \mu\text{g.L}^{-1}$). Larvae were immobilized in left lateral view with 3 % methylcellulose under dissecting microscope (Olympus SZX9, 10x). Then, larvae were photographed using a DMK 31AU03 camera and IC Capture 2.2 software (both The Imaging Sources, Germany). From these pictures, head length (from terminal point of lower jaw to rear operculum), standard body length (from terminal point of lower jaw to the end of tail without caudal fin) and yolk sac area (including swim bladder area) were measured with ImageJ software (Schneider et al. 2012). Furthermore, morphological abnormalities were recorded individually based on the sublethal endpoints as described in Lammer et al. (2009). Abnormalities scored were: 1- Edema formation (brain, pericardia, yolk sac); 2- Skeletal deformities (scoliosis, lordosis, tail bud deformities); 3- Craniofacial deformities (jaw, development of eyes, head deformities); 4- Cardiac deformities (anemia, hemorrhage, atrium/ventricle size, blood circulation heart position); 5- Yolk sac malabsorption. Abnormalities were analyzed with a scoring system from 0 to 3 according to their occurrence and severity: (0) healthy larvae, (1) one abnormality or mildly-affected, (2) two abnormalities or moderately affected and (3) three or more abnormalities or severely affected larvae. In addition, general developmental retardation was noted. Results were expressed as a percentage of the surviving, exposed population.

Behavioral test by monitoring of PhotoMotor Response: behavioral tests were conducted to monitor photomotor response (PMR), following the procedure described by Péan et al. (2013) with slight modifications. The day before analysis, 4 dpf larvae were acclimated individually in a 24 well-plate (Krystal 24, transparent bottom and opaque walls) with 2 mL of E3 medium in a climate chamber ($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Well-plates were covered with a lid to avoid evaporation and were transferred two hours before video tracking in an analysis room ($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$) the following day to perform behavioral analysis. Behavioral analyses were performed during a period of stable activity (between 1 and 6 pm) for zebrafish according to MacPhail et al. (2009). Larvae were filmed in a lightproof and temperature-controlled box with a DMK31AU03 camera (The Imaging Sources, Germany) and lens Fujinon (1.4-12.5 mm) and IC Capture 2.2 software (The Imaging Sources, Germany). An infrared floor in the box was used to record in both light and dark conditions. Larvae were placed in the box five minutes before recording their behavior in order to acclimatize them to light. Recording covered three periods: 5 min Light On (1), 5 min Light Off and 5 min Light On (2). Video analyses were performed with Ethovision 8.5 software (Noldus, The Netherlands). The behavioral

performances of larvae (30 per PAH treatments) were assessed by measuring the distance moved (cm) during the three periods of the light/dark/light challenge. The distance moved is calculated by the difference between the center point of the larvae from two consecutive X-Y coordinates summed over a 5-min period.

In vivo EROD activity: *in vivo* EROD activity was measured on 15 zebrafish larvae per treatment. The assay was performed according to Carney et al. (2004) and Otte et al. (2010) with slight modifications. Briefly, individual larvae (96 hpf) from each replicate treatment were incubated in 21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 7-ethoxyresorufin dissolved in 1 mL of E3 for 5 hours. Larvae were then anesthetized with 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ benzocaine and mounted in 3 % methylcellulose to immobilize them (left lateral view) for observation of the yolk sac. The entire procedure was performed in light-protected conditions and at 28 ± 0.5 °C. Fluorescence of the resorufin was examined under a fluorescence microscope (Olympus BX41, 100x) equipped with a Rhodamin red filter (excitation/emission: 560 nm/580 nm). The yolk sac of larvae was photographed with a camera (DMK31AU03) and IC Capture 2.2 software (both The Imaging Sources, Germany). Image analysis was done with HeatMap Histogram *plugin* (Péan S., <http://www.samuelpean.com/heatmap-histogram/>) from ImageJ software (Schneider et al. 2012). For EROD analysis, a Control treatment composed of 15 non-sediment exposed larvae was analyzed in addition. Results were expressed in integrated density of pixels (arbitrary unit).

2.5. Medaka embryo-larval assay

Japanese medaka exposure (Fig.1 Supplementary data): The fish embryo-larval toxicity test was performed as described in Le Bihanic et al. (in press). 1 dpf medaka embryos (CAB strain providing GIS-Amagen (INRA), Jouy-en-Josas, France) were exposed using the same procedure as for zebrafish embryos with some modifications adapted to the longer embryonic development time. Embryos were exposed throughout embryonic development until the hatching peak (11 dpf) at 26 ± 0.3 °C with a 12h light/12h dark photoperiod. During the exposure, artificial water was renewed daily. Egg Rearing Solution ERS was used as artificial water (85.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂ and 1.4 mM MgSO₄). After hatching, larvae were observed and transferred to a new Petri dish containing a mix of osmose water and tap water. The experiment was halted three days post hatching peak.

Morphological endpoints: similar morphological endpoints were analyzed for medaka embryo-larval assay and are described in Le Bihanic et al. (in press). As for zebrafish embryo-larval assay, the survival rate, hatching success, biometric analysis, abnormalities and heartbeat (in supplementary data) were analyzed at different experiment times according to the medaka embryonic development.

Behavioral test by monitoring of PMR: PMRs were measured in similar conditions to zebrafish assay with slight adaptations for Japanese medaka. 14 dpf larvae were acclimated individually for 2 hours in a 48 well-plate with 500 μl of ERS in the dark inside the Daniovision chamber (Noldus, The Netherlands) at 23°C. 18 larvae per treatment were filmed

with an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) during four periods of 10 min : 10 min Light Off (1), 10 min Light On (1), 10 min Light Off (2) and 10 min Light On (2). The analysis time was increased, and a dark period was added at the start of the challenge due to the higher swimming activity in medaka compared to zebrafish. This supplementary phase enabled their swimming to be stabilized so as not to skew the challenge. The video analyses were then performed with Ethovision 9.0 software (Noldus, The Netherlands). As for zebrafish assay, the behavioral performances of larvae were assessed by measuring the distance moved (cm) during the four periods of the dark/light/dark/light challenge.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 software (StatSoft, USA). A one-way ANOVA was conducted for each variable and treatment to assess differences between experimental replicates. If no difference between replicates was detected, the three replicates were considered as a homogenous group. Normality and homoscedasticity of the data were verified using Shapiro-Wilk and Levene tests respectively. For percent survival, hatching and abnormalities data, Fisher tests were performed. Student's t tests were performed for the biometric analysis and the PMR in order to assess the effects of the different exposure treatment (BaP, Fluo) with their respective Solvent control. EROD data were analyzed using a one-way ANOVA supplemented by a *post-hoc* Tukey test. When the parametric assumptions were not respected, the non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were conducted. The behavioral data for Japanese medaka assay were analyzed with an ANOVA (Le Bihanic et al. submitted a). Results were expressed as mean \pm SEM. The statistical significance threshold was fixed at $p=0.05$.

3. Results

3.1. Chemical analysis of spiked sediments

Spiking efficiencies of PAH on sediment ranged from 17 to 63 % depending on peat concentrations and the compound analyzed (Table 1 Supplementary data). For BaP, they were of 17, 18 and 20 % for 0, 2.5 and 5 % peat respectively. Fluo spiking efficiency was slightly higher for no-peat sediment (63 %) than for 2.5 % (59 %) and 5 % peat (44 %).

3.2. Zebrafish embryo-larval assay

Survival and hatching success: the survival and hatching success of zebrafish embryos during BaP and Fluo exposures are shown in Table 1. Whatever the peat proportion, the BaP tested concentration did not induce lethal effects on embryos and larvae, while that was the case for the Fluo exposure. The survival rate for BaP-exposed fish ranged from 89.9 to 95.6 % at the end of the exposure (96 hpf) and from 88.9 to 92.2 % at 10 dpf. In contrast, 0 % and 5 % Fluo-spiked sediments induced a significant decrease in survival compared to the solvent

control group with 54.6 % and 83.5 % respectively (Fisher, $p < 0.01$). For 2.5 % peat Fluo-spiked sediment, no significant larval mortality was observed with 95.6 % and 96.7 % for the Solvent and Fluo survival rate respectively (Fisher, $p > 0.05$).

BaP did not induce a hatching delay for all three sediment peat contents (success varied from 95.2 to 100 %). In contrast, hatching success was significantly reduced by Fluo in 0 and 5 % peat sediment as compared to respective control group (decreasing of 10.4 % and 13.5 %, $p = 0.005$ and $p = 0.004$ respectively).

Table 1 Viability and hatching success of zebrafish assessing BaP and Fluo toxicity regarding different peat sediment contents

			Survival rate (%)		Hatching success (%)
			96 hpf	10 dpf	96 hpf
0 % peat	Solvent	n= 89	89.9	89.9	100
	BaP	n= 90	95.6	92.2	100
2.5 % peat	Solvent	n= 90	93.3	87.8	95.2
	BaP	n= 90	94.4	92.2	100
5 % peat	Solvent	n= 90	93.3	88.9	100
	BaP	n= 90	92.2	90.0	100
0 % peat	Solvent	n= 90	97.8	96.7	100
	Fluo	n= 90	54.6*	46.6*	89.6*
2.5 % peat	Solvent	n= 90	95.6	93.3	100
	Fluo	n= 90	96.7	96.7	96.5
5 % peat	Solvent	n= 90	96.7	94.4	97.7
	Fluo	n= 90	83.5*	82.4*	84.2*

Asterisks indicate significant differences with respective Solvent control (Fisher test, $p < 0.05$)

Table 2 Developmental endpoints for assessing teratogenicity of BaP on larval zebrafish with different peat sediment contents

	0 % peat		2.5 % peat		5 % peat	
	Solvent	BaP	Solvent	BaP	Solvent	BaP
	n=35	n=38	n=35	n=40	n=39	n=38
Standard length (mm)	3.57 ± 0.03	3.57 ± 0.03	3.58 ± 0.03	3.62 ± 0.02	3.60 ± 0.03	3.60 ± 0.02
Ratio Head/Standard length (%)	18.3 ± 0.11	18.6 ± 0.14	18.6 ± 0.15	18.2 ± 0.18	18.6 ± 0.14	18.5 ± 0.11
Yolk sac area (mm ²)	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Ratio Yolk sac/Whole larval area (%)	26.4 ± 0.41	26.4 ± 0.53	26.6 ± 0.42	25.5 ± 0.37	26.6 ± 0.68	26.4 ± 0.48
Abnormal individuals (%)	2.86	7.89	14.3	10.0	7.69	5.26
Severity of abnormality (Scoring/3) (%):						
No affected (Score 0)	97.1	92.1	85.7	90.0	92.3	94.7
Mild (Score 1)	0.00	2.63	2.86	7.50	0.00	0.00
Moderate (Score 2)	0.00	2.63	2.86	0.00	0.00	0.00
Severe (Score 3 or more)	2.86	2.63	8.57	2.50	7.69	5.26
Abnormalities among abnormal individuals (%):						
Oedemas	1.43	2.63	5.10	3.33	3.21	1.50
Axial Skeleton	0.00	1.32	4.08	5.00	1.92	1.50
Craniofacial	0.71	1.32	4.08	1.67	2.56	1.50
Cardiovascular	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yolk sac malabsorption	0.71	2.63	1.02	0.00	0.00	0.75
Developmental retardation (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

No significant differences were observed (p>0.05)

Table 3 Developmental endpoints for assessing teratogenicity of Fluo on larval zebrafish with different peat sediment contents

	0 % peat		2.5 % peat		5 % peat	
	Solvent n=43	Fluo n=18	Solvent n=41	Fluo n=39	Solvent n=41	Fluo n=19
Standard length (mm)	3.45 ± 0.02	3.11 ± 0.09*	3.41 ± 0.02	3.40 ± 0.02	3.30 ± 0.02	3.17 ± 0.02*
Ratio Head/Standard length (%)	18.3 ± 0.10	16.4 ± 0.42*	17.7 ± 0.16	17.2 ± 0.20	17.0 ± 0.16	17.3 ± 0.20
Yolk sac area (mm ²)	0.31 ± 0.01	0.40 ± 0.02*	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Ratio Yolk sac/Whole larval area (%)	27.0 ± 0.40	39.0 ± 2.50*	27.0 ± 0.40	28.0 ± 0.50*	30.0 ± 0.80	32.0 ± 0.90*
Abnormal individuals (%)	4.65	22.2	7.32	2.56	2.44	10.5
Severity of abnormality (Scoring/3) (%):						
No affected (Score 0)	95.4	77.8	92.7	97.4	95.1	79.0
Mild (Score 1)	2.33	11.1	7.32	2.56	2.44	15.8
Moderate (Score 2)	0.00	11.1	0.00	0.00	2.44	5.26
Severe (Score 3 or more)	2.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Abnormalities among abnormal individuals (%):						
Oedemas	1.16	11.1	7.32	2.56	0.00	3.51
Axial Skeleton	1.16	7.41	0.00	0.00	2.44	3.51
Craniofacial	1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	3.51
Cardiovascular	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yolk sac malabsorption	1.16	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00
Developmental retardation (%)	2.00	56.0*	0.00	10.0	49.0	100*

Asterisks indicate significant differences with respective Solvent control (p<0.05)

Biometric measurements: biometric measurements of 96 hpf larvae exposed to BaP or Fluo for each peat content are shown in Tables 2 and 3, respectively. BaP exposure did not induce modifications of larval biometric parameters whatever the sediment peat contents (Table 2) whereas larvae exposed to Fluo had developmental retardation (Table 3). For 0 % peat content, standard body length and ratio head/standard length were significantly reduced in Fluo-exposed larvae (1.1 fold smaller as compared to control larvae, Student's t, $p < 0.001$ each). In contrast the yolk sac area and yolk sac/whole larval area ratio were significantly increased by 1.3 and 1.4 fold respectively (Student's t, $p < 0.001$). For 2.5 % peat content, no biometric modifications were observed between treatments except for the yolk/whole larval area ratio in Fluo-exposed larvae (1.04 fold) that were significantly increased (Student's t, $p = 0.04$). In the case of 5 % peat content, larvae exposed to Fluo had a yolk sac/whole larval area ratio 1.1 fold larger than control larvae (Student's t, $p = 0.04$). These larvae also showed a significant reduction in standard body length (Student's t, $p = 0.004$).

Morphological abnormalities: the percentage of abnormal individuals at 96 hpf, and the different abnormalities and severity are also summarized in Tables 2 and 3 for BaP for Fluo treatments, respectively. Peat concentration in each treatment did not induce significant morphological abnormalities compared to the respective control (Fisher, $p = 0.61$, $p = 0.73$ and $p = 1.0$ for 0 %, 2.5 % and 5 % respectively). No developmental retardation was observed in BaP exposed larvae whatever the peat concentration. In the absence of peat, 56 % of Fluo-exposed larvae exhibit a delayed development and 100 % of larvae at the highest peat concentration. 49 % of larvae display developmental retardation at the highest peat concentration.

In vivo EROD activity: EROD activities in 96 hpf zebrafish larvae exposed to BaP, showed a significant induction over Solvent control and Control treatment for 0 and 5 % peat (Fig. 1A). EROD activity increased significantly from 2.4 to 1.6-fold compared to Solvent control, for 0 and 5 % peat respectively (ANOVA, $p < 0.001$). No increase was observed for 2.5 % peat (ANOVA, $p = 0.12$). For EROD activity measured in larvae exposed to Fluo-spiked sediment with 2.5 % peat (Fig. 1B), a significant 2.4-fold induction was observed over the Solvent control (ANOVA, $p = 0.03$) but not over the Control treatment (ANOVA, $p = 0.58$). No significant difference in EROD activity was, however, recorded between both controls (ANOVA, $p = 0.33$). Similarly, no significant difference was observed in larvae exposed to Fluo spiked-sediment with 0 % and 5 % peat (ANOVA, $p = 0.22$ and KW, $p = 0.05$ respectively).

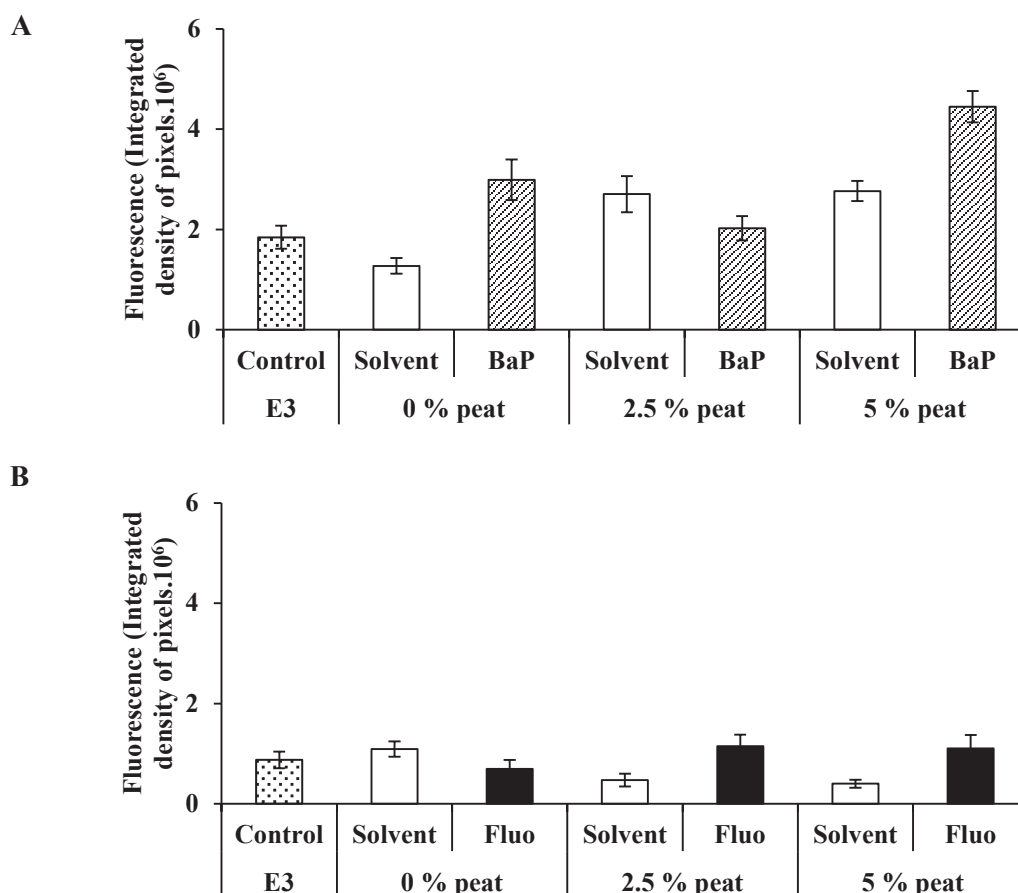


Fig. 1 *In vivo* measurement of EROD activity in 96 hpf zebrafish larvae exposed to BaP (A) and Fluo (B) for different peat sediment contents. All data are presented as mean \pm SEM, n=15 per treatment. Asterisks indicate significant differences with Control treatment and Dark traits between others treatments (ANOVA, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

3.3. Photomotor behavioral response of larvae

Zebrafish larvae PMR: PMR of zebrafish larvae (at 120 hpf) exposed to BaP in different conditions of peat are shown in Fig. 2. The response patterns of larvae were similar for each peat condition showing an increase in the distance moved during the stress period (Light Off). BaP larvae swimming activity was significantly reduced compared to the Control treatment only in Light Off period for 0 % peat condition (Fig. 2A). Fish from all treatments 2.5 % and 5 % showed a similar response pattern to the challenge and no significant differences in swimming activity were observed (Student's t , $p > 0.05$) (Fig. 2B, 2C). PMR of zebrafish larvae (at 120 hpf) exposed to Fluo in different conditions of peat are shown in Fig. 3. Swimming activity was significantly decreased whatever the periods for the condition without peat (Fig. 3A). No significant differences were observed between Fluo and Solvent treatments for 2.5 % and 5 % peat conditions (Student's t , $p > 0.05$) (Fig. 3B, 3C).

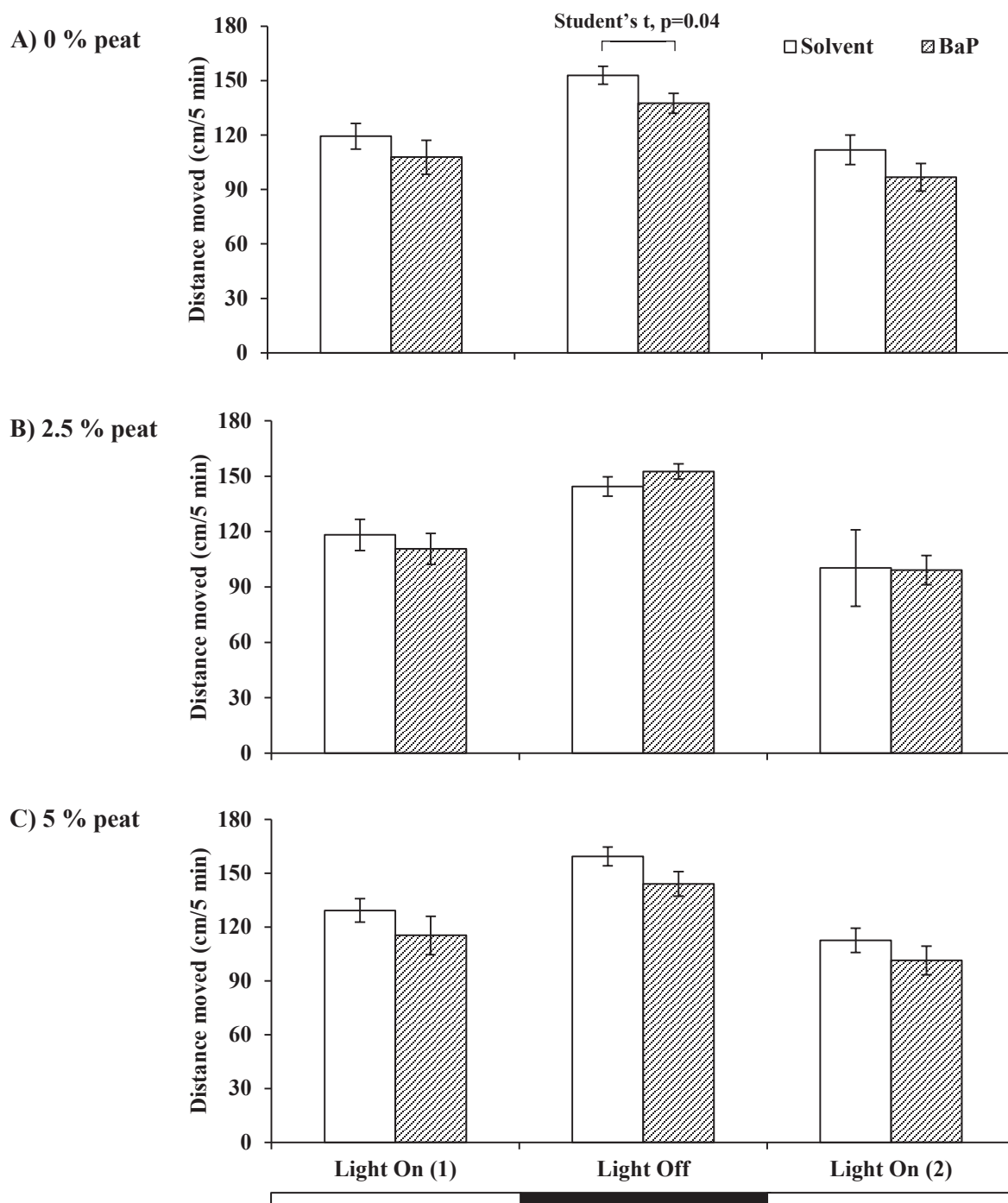


Fig. 2 PMR measured in 120 hpf zebrafish larvae exposed to BaP. The locomotor activity of larvae in each 5-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B), 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, $n=30$ per treatment. Dark traits indicate significant differences with respective Solvent Control (Student's t, $p<0.05$).

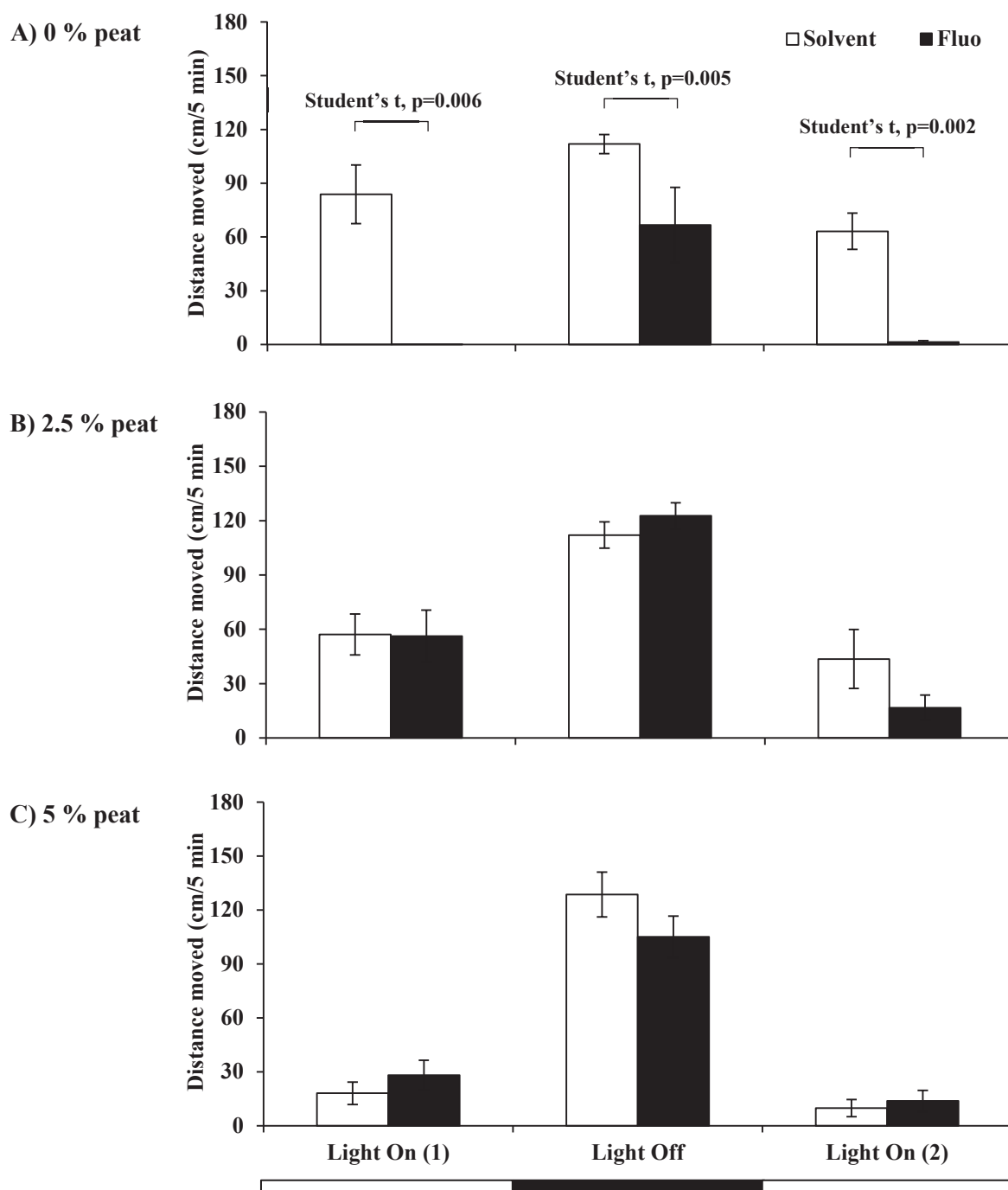


Fig. 3 PMR measured in 120 hpf zebrafish larvae exposed to Fluo. The locomotor activity of larvae in each 5-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B) and 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, n=30 per treatment. Dark traits indicate significant differences with respect to Solvent Control treatment (Student's t, $p < 0.05$).

Japanese medaka larvae PMR: PMR of Japanese medaka (14 dpf) exposed to BaP and Fluo are shown in Fig. 4. The first dark period is performed to stabilize the swimming activity of larvae. The response patterns of larvae were similar for each peat condition showing an increased swimming activity during Light Off (2) period. 0 % BaP-exposed larvae swam significantly greater distances than Solvent control larvae (Fig. 4A). The swimming activity

of 0 % Fluo-exposed larvae was not significantly different compared to Solvent control (ANOVA, $p>0.05$). Regarding 2.5 % peat condition, whatever PAH considered, no significant differences in swimming activity were observed (ANOVA, $p>0.05$). PMR of larvae in 5 % peat condition showed an opposite response pattern to the larvae in condition without peat. The distance moved by BaP-exposed larvae was only significantly lower in the first light period compared to Solvent control larvae. Fluo-exposed larvae swam significantly 1.9-fold less for Light On (1) and 1.8-fold less for Light Off (2) periods than Solvent control larvae.

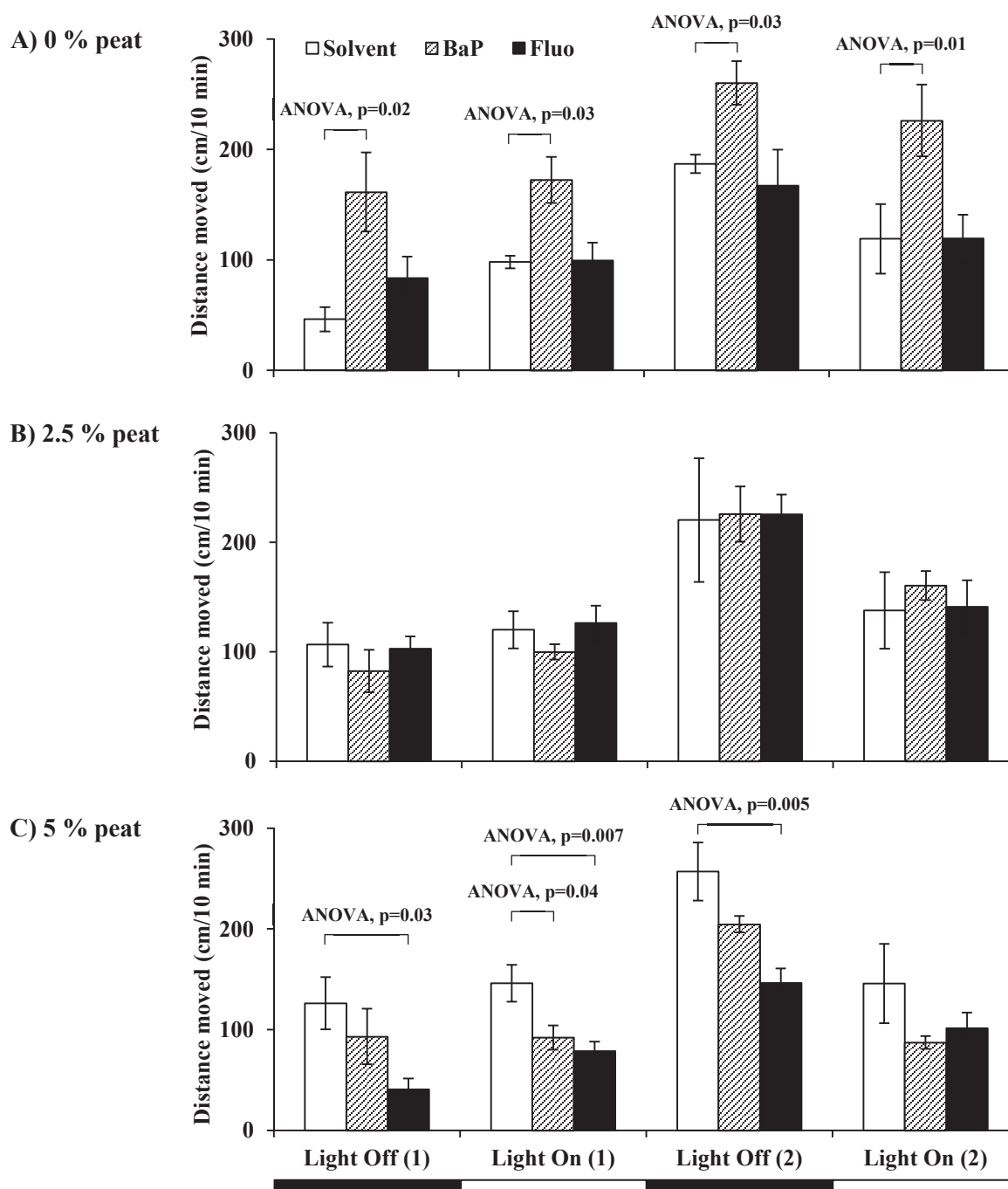


Fig. 4 PMR measured in 14 dpf Japanese medaka larvae exposed to BaP and Fluo. The locomotor activity of larvae in each 10-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B) and 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, n=15 per treatment. Dark traits indicate significant differences with Solvent Control treatment (ANOVA, $p < 0.05$).

3.4. Toxic responses comparison of zebrafish and medaka embryo-larval assays

Synthetic results of lethal and sublethal endpoints assessed further to both assays with different composition of artificial sediment are summarized in Tables 4 and 5 for BaP and for Fluo exposures, respectively. No toxic effects of BaP were reported in zebrafish and medaka exposures at 0 % and 5 % peat, except for the photomotor responses. BaP induced a slight decrease in locomotor activity during the stress period in zebrafish whereas high hyperactivity was shown in medaka. Furthermore, neither survival, nor hatching, nor morphology or behavior disruptions were recorded in zebrafish at intermediate peat concentration. In contrast, BaP appeared more available for medaka at 2.5 % peat, leading to hatching kinetic and morphometric alterations. Regarding Fluo exposure, completely opposite toxicity responses were reported in both species for each artificial sediment tested. Acute toxicity effects of Fluo were recorded in zebrafish at 0 % and 5 % peat content compared to Japanese medaka. These effects were expressed by embryo-larval mortality, hatching, morphometric alterations and a significant lethargic activity of fish. The intensity of effects was more representative of Fluo intrinsic toxicity at 0 % than 5 % peat due to higher bioavailability. In Japanese medaka, Fluo toxicity showed significant abnormalities for both concentrations. In addition, a significant lethargic activity of fish at 5 % peat was observed, revealing potential neurological alterations.

Table 4 Comparison of BaP toxicity to zebrafish and Japanese medaka (Le Bihanic et al., in press) early life stages for different peat concentrations in artificial sediment

		zebrafish			Japanese medaka		
		96 hpf			12 dpf		
		0%	2.5 %	5%	0%	2.5 %	5%
Survival/Hatching	Embryo-larval mortality	No	No	No	No	No	No
	Hatching success	No	No	No	No	No	No
	Hatching Time	No	No	No	No	Yes (+)	No
Morphology	Larval body length	No	No	No	No	No	No
	Yolk sac area	No	No	No	No	Yes (-)	No
	Abnormal individuals	No	No	No	No	No	No
Behavior	Photomotor response	Yes (-)	No	No	Yes (+)	No	No

Signs in brackets indicate significant inductor/increase (+) or inhibitor/decrease (-) effect compared to the Solvent Control respective

Table 5 Comparison of Fluo toxicity to zebrafish and Japanese medaka (Le Bihanic et al., in press) early life stages for different peat concentrations in artificial sediment

		zebrafish			Japanese medaka		
Exposure time		96 hpf			12 dpf		
Peat concentration		0%	2.5 %	5%	0%	2.5 %	5%
Survival/Hatching	Embryo-larval mortality	Yes (+)	No	Yes (+)	No	No	No
	Hatching success	Yes (-)	No	Yes (-)	No	No	No
	Hatching Time	No	No	No	No	Yes (+)	No
Morphology	Larval body length	Yes (-)	No	Yes (-)	No	No	No
	Yolk sac area	Yes (+)	No	No	No	Yes (-)	No
	Abnormal individuals	No	No	No	Yes (+)	Yes (+)	Yes (+)
Behavior	Photomotor response	Yes (-)	No	No	No	No	Yes (-)

Signs in brackets indicate significant inductor/increase (+) or inhibitor/decrease (-) effect compared to the Solvent Control respective

4. Discussion

In recent decades, a number of different ecotoxicity tests have been developed demonstrating the robustness of fish embryo-larval assays to reflect the toxicity of organic pollutants. Zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) have shown reliable results in toxicity assessment using aqueous exposure. In the case of hydrophobic compounds, direct waterborne exposure is not suitable and therefore alternative tests had to be developed. This was achieved by exposing zebrafish and medaka embryos to natural sediment and spiked sediment (Hollert et al. 2003; Vicquelin et al. 2011). In order to standardize the embryo-larval assay for toxicity measurement of hydrophobic compounds, a screening procedure using artificial sediment with varying peat content was developed in parallel on zebrafish (present study) and Japanese medaka (Le Bihanic et al. in press). The responses of zebrafish and Japanese medaka to two PAH models, the 5-ring PAH benzo[a]pyrene (BaP) and the 3-benzenic-ring PAH fluoranthene (Fluo), were assessed in order to validate the suitability of artificial sediment composition. Using similar PAH-spiked sediment, exposure routes and toxicity endpoints at the molecular (EROD activity), morphological and behavioral levels, it was shown that toxicity thresholds and the intensity of responses of both these species were different.

Our results on zebrafish as well as medaka embryo-larval assays, suggest that PAH bioavailability is reduced by increasing the content of organic matter in the artificial sediment. This finding is consistent with field studies demonstrating that the bioavailability of PAH is highly dependent on the concentration of organic matter and their interaction (Fanget et al. 2002; Guasch et al. 2012). Furthermore, the spiking efficiencies of BaP in the prepared sediments also support this postulation, but not for Fluo. Indeed, a reduction of Fluo-spiking efficiency was observed with increasing peat concentration. The high sorption capacity of compounds to the organic matter is linked to the high hydrophobicity natures of both BaP ($\text{Log } K_{ow} = 6.04$) and Fluo ($\text{Log } K_{ow} = 5.16$). Humic substances act as a trap for hydrophobic molecules which in turn reduce both their dissolved concentrations in the water column and their subsequent bioaccumulation in living organisms (Akkanen and Kukkonen 2003; Akkanen et al. 2005; Haitzer et al. 1999; Laor et al. 1998; Mayer et al. 2007). In the present study, the toxicity of both hydrophobic compounds was consistent with their toxic properties. BaP is known to be genotoxic, carcinogenic and immunotoxic (Carlson et al. 2004; Costa et al. 2011; Wessel et al. 2010) whereas Fluo has rather teratogenic and mutagenic properties (Wessel et al. 2012). BaP exposure did not induce mortality, hatching failure or delayed hatching in zebrafish embryo-larval assays. Moreover, BaP did not lead to teratogenic effects (Table 3). Somewhat different results have been reported for BaP-exposed medaka embryos (Le Bihanic et al. in press). A few teratogenic effects were observed in medaka, and contrary to zebrafish, a significant effect on the rate of embryonic development was noted. This compound is not known to directly induce developmental effects. In contrast with BaP-exposed zebrafish larvae, significant biometric developmental defects were observed in Fluo-exposed embryos. These effects are reflected by an increasing mortality, a lack of embryo hatching and alterations in growth and development (Tables 2 and 4). Although morphological abnormalities are currently used as sensitive endpoints in embryo-larval assay (Lammer et al. 2009; Nagel 2002), neither edemas, axial skeleton, craniofacial or cardiovascular abnormalities were recorded during Fluo exposure. Furthermore, the decrease in larval standard length and the increase in their yolk sac area caused by Fluo exposure in the absence of peat attest to a developmental delay.

At the molecular level, significant induction of enzymatic EROD activity in zebrafish assays only appeared in the absence of peat and at the highest peat concentration during BaP exposure (Fig. 1A). The EROD activity modulation by BaP is in general agreement with AhR

agonist properties of this compound. The ability of BaP to induce EROD activity (indicator of phase I biotransformation activities) through the AhR2 pathway has been established in marine fish (Au et al. 2004; Barron et al. 2004) and freshwater fish (Bols et al. 1999; Costa et al. 2011; Incardona et al. 2011; Noury et al. 2006). Regarding the results of Fluo exposure, no significant induction of EROD activity was observed compared to the Control treatment. A mild induction of EROD activity was observed for 2.5% peat condition compared to 2.5% peat Solvent Control. EROD activity in this Control is rather low compared to other Control conditions; therefore induction of EROD in 2.5% peat condition may not be meaningful. The absence (or weak) induction of EROD by Fluo is in agreement with the inhibitory activity of this PAH on cytochrome P450 1A enzyme (Van Tiem and Di Giulio 2011; Willett et al. 2001; Willett et al. 1998). Unfortunately, the EROD enzymatic activity was not measured in Japanese medaka.

Zebrafish larval behavioral assay was a robust endpoint in toxicity testing (Ali et al. 2012; Bilotta et al. 2002; MacPhail et al. 2009). The assessment of the developmental neurotoxic effects of various compounds can be analyzed through their swimming capacity, stress-regulating systems and motor responses (perception and reaction) to stimuli (Champagne et al. 2010; Drapeau et al. 2002; de Esch et al. 2012; Linney et al. 2004). Studies regarding behavioral effects in fish have been extensively reported using psychotropic substances (Ali et al. 2012; Cowden et al. 2012; Kokel et al. 2010; Padilla et al. 2011; Rihel et al. 2010) but poorly investigated for other pollutants. In the present study, a significant decrease of PMR in zebrafish was observed for the highest concentration of Fluo in the absence of peat. Moreover for each peat concentration tested, the zebrafish larvae presented a similar behavioral pattern (Fig. 3). The first light period (5 min in duration, Light On (1)) reflected basal activity which was followed by an excitation phase characterized by an increase in locomotor activity during the sudden darkness period. Then, a return to the basal activity period corresponding to a recovery phase was observed (Light On (2)). This pattern of response is consistent with previous results reported in the literature (Kokel et al. 2010; MacPhail et al. 2009; Padilla et al. 2011). Concerning Japanese medaka, the potential toxicity of PAH on larval behavior assays was analyzed for the first time in this study. BaP led to an increase in PMR in the absence of peat which was suppressed in the highest tested peat concentration. In contrast, Fluo decreased in PMR in this later exposure condition. The Japanese medaka PMR pattern was similar to that for zebrafish. Only a few studies have examined the impact of organic pollutant on the fish PMR. Using a similar approach, Péan et al. (2013) reported a stimulation of this PMR following PCB contamination transferred to offspring zebrafish larvae. Furthermore, changes in zebrafish swimming rates, depending on PBDE congeners, have been shown by Usenko et al. (2011). Additionally, a PAH lethargic effect on hunting behavior and visual acuity was demonstrated by Gonçalves et al. (2008) in juveniles gilthead seabream (*Sparus aurata*). Even more poorly explored, the behavioral effects of organic pollutants clearly merit further research.

When we compare the findings from the experiment on zebrafish and medaka, it appears that the toxicity of PAHs is dependent on their bioavailability, directly related to their adsorption ability on particles of peat. In sediment, the 5-ring BaP appeared less bioavailable than the 3-benzenic rings Fluo for accumulation in fish. These findings are consistent with the studies of Varanasi et al. (1985) and Djomo et al. (1996) which demonstrated that the uptake rate of 4,5-ring PAHs are lower than those of 2,3-ring PAHs. Indeed, in the absence of peat, Fluo may be more labile and consequently more easily uptaken by embryos. Fluo may have passed passively through the chorion, and led to adverse effects on embryos. Indeed, lethal effects were reported in zebrafish and a high proportion of abnormalities were observed in medaka. The bioavailability pattern of Fluo for zebrafish and medaka embryos was somewhat different for 2.5 % and 5 % peat. Particles of blond peat were seen to be fixed to the surface of clay

particles and to limit PAHs accessibility to binding sites, decreasing exchanges and PAHs metabolism (Fang et al. 2002). However, following Fluo exposure, important developmental defects and developmental retardation were observed in zebrafish at the highest concentration of peat (5 %). Because of the high proportion of peat, PAHs on binding sites could be saturated and would be then slightly less available for embryos than in condition without peat not leading to lethal effects. All these results proved that zebrafish seem to be more sensitive to the physical properties of sediment compared to medaka. This sediment tended to clog eggs, might limit optimal gas exchange and therefore alter embryonic development. Abnormal results are strongly suspected for the condition 2.5 % peat in zebrafish assays, which Fluo should induce intermediate toxicity (see the above section on EROD).

Taking into consideration the results of both zebrafish and medaka toxicity testing (Le Bihan et al., in press), an artificial sediment without peat was suitable for zebrafish and with 2.5 % peat for medaka. The primary purpose of this experiment was to develop an artificial sediment resembling a composition of natural sediment in order to standardize sediment exposure methods. Regarding all results for both species with respect to ethical requirements (3R principles and early developmental stages guidelines), Medaka embryo-larval assay with sediment contact appears to be more robust than zebrafish embryo-larval assay for revealing BaP and Fluo toxic effects and more resilient to the physico-chemical properties of sediment. This higher degree of sensitivity of zebrafish could be due to a higher porosity of chorion and therefore the higher diffusion of compounds (see the section on acute effects). Using a concentration set to 2.5 % peat, the degree of sensitivity of the medaka would be mainly due to its sensitivity to PAHs and to a longer exposure duration during the critical embryonic developmental period, as well as due to the metabolic activity. Indeed, the embryonic phase in medaka at 26 °C ranges from 10 to 11 days compared to 2 days in zebrafish (Kimmel et al. 1995; Padilla et al. 2009). In this context, our findings support the premise that medaka would constitute a better model for testing the toxicity of hydrophobic chemicals (such as PAHs) testing than zebrafish, although zebrafish assay has been demonstrated to be a valuable alternative when short-time exposures are targeted. The use of finer markers representative of the early toxic actions of hydrophobic compounds, in addition to conventional phenotypic endpoints, would appear to be essential in predicting their toxicity (Voelker et al. 2007) as it will increase the sensitivity and relevance of biological responses. In the absence of this information, molecule or treatment safety could be over or underestimated.

5. Conclusion

As a complement to previous research into Japanese medaka by Le Bihan et al. (in press), our study validated the use of artificial sediment for developmental toxicity testing using fish embryo-larval assay for Japanese medaka. Suitable artificial sediment comprises 92.5 % dw of 0.2-0.5 mm silica, 5 % dw kaolin clay and 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat. This composition was not suitable for zebrafish for which responses were more sensitive to sediment without organic matter. Consequently, this suggests that a common protocol cannot be proposed for these two species from an OECD guidelines point of view. Furthermore, this study demonstrated that two physiologically-close fish species exhibited differences in their ability to reflect the relative developmental toxicities of hydrophobic organic pollutants. These differences might be explained by differences in their developmental kinetics (leading to a different exposure duration), 2) in their adsorption/metabolism capacities and cell damage repair abilities. Japanese medaka appear better suited to toxicity assessment of hydrophobic compounds such as PAHs. Finally, to avoid any misinterpretation regarding the

risk assessment to human or environment health, we recommend that several OECD fish species should be systematically considered.

Acknowledgments

Financial support for PhD grants was received by FLB from the Ministère de l'Enseignement de Supérieur et de la Recherche and by PP from both the Conseil Général de Charente Maritime and the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer). This research was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche, program "Contaminant, Ecosystème et Santé", within the framework of the ConPhyPoP (2009-002) research project and CPER A2E. This project is co-financed by the European Union with the European Regional Development Fund. S. Keiter and H. Zielke are acknowledged for their recommendation on sediment preparation and the Sibelco Company for generously providing sand. D. Leguay is acknowledged for technical support of zebrafish behavioral assays and L. Lyphout for help in the zebrafish breeding maintenance. This research was part of the LABEX COTE cluster of excellence "continental to coastal ecosystems".

References

- Ahlf W, Hollert H, Neumann-Hensel H, Ricking M (2002) A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality. *J Soils Sediments* 2:37–42.
- Akkanen J, Kukkonen JVK (2003) Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem* 22:518–524.
- Akkanen J, Lyytikäinen M, Tuikka A, Kukkonen JVK (2005) Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* 60:1608–1615.
- Ali S, Champagne DL, Richardson MK (2012) Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behav Brain Res* 228:272–83.
- Amara R, Meziane T, Gilliers C, Hermel G, Laffargue P (2007) Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Mar Ecol Prog Ser* 351:201–208.
- Au DWT, Chen P, Pollino C (2004) Cytological changes in association with ethoxyresorufin o-deethylase induction in fish upon dietary exposure to benzo[a]pyrene. *Environ Toxicol Chem* 23:1043–1050.
- Barron MG, Carls MG, Heintz R, Rice SD (2004) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol Sci* 78:60–67.
- Bartzke M, Delov V, Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Oehlmann J (2010) Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the Water Framework Directive approach. *J Soils Sediments* 10:389–399.

- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western mediterranean sea. *Environ Chem* 17:765–776.
- Behar F, Leblond C, Saint-Paul C (1989) Analysis of pyrolysis effluents in an open and closed system. *Oil and Gas Sci Technol* 44:387–411.
- Belanger SE, Balon EK, Rawlings JM (2010) Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat Toxicol* 97:88–95.
- Bilotta J, Saszik S, Givin CM, Hardesty HR, Sutherland SE (2002) Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicol Teratol* 24:759–766.
- Bols NC, Schirmer K, Joyce EM, Dixon DG, Greenberg BM, Whyte JJ (1999) Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-*o*-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:118–128.
- Braunbeck T, Boettcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz N (2005) Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update. *Altex* 22:87–102.
- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, LeMenach K, Garrigues P (2000) Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J Anal Chem* 367:165–171.
- Burton JGA (2002) Sediment quality criteria in use around the world. *Limnol* 3:65–76.
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79:257–267.
- Carlson E, Li Y, Zelikoff JT (2004) Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:40–52.
- Carney SA, Peterson RE, Heideman W (2004) Hydrocarbon receptor / aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Molecular Pharmacol* 66:512–521.
- Castaño A, Bols N, Braunbeck T, Dierickx P, Halder M, Isomaa B, Kawahara K, Lee LEJ, Mothersill C, Pärt P, Repetto G, Sintes JR, Rufli H, Smith R, Wood C, Segner H (2003) The use of fish cells in ecotoxicology. *Alter to Lab Anim* 31:317–351.
- Champagne DL, Hoefnagels CCM, de Kloet RE, Richardson MK (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res* 214:332–342.
- Costa J, Ferreira M, Rey-Salgueiro L, Reis-Henriques MA (2011) Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 84:1452–1460.
- Cowden J, Padnos B, Hunter D, MacPhail R, Jensen K, Padilla S (2012) Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod Toxicol* 33:165–73.

- Dabestani R, Ivanov IN (1999) A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem and Photobiol* 70:10–34.
- Daouk T (2011) Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP. Thesis (in French), 162 pages.
- Djomo JE, Garrigues P, Narbonne JF (1996) Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 15:1177–1181.
- Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E (2002) Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol* 68:85–111.
- EC (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off J Eur Parliament* L327:1–82.
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck T, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard M, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97:79–87.
- De Esch C, van der Linde H, Sliker R, Willemsen R, Wolterbeek A, Woutersen R, De Groot D (2012) Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 34:425–433.
- Fanget B, Devos O, Naffrechoux E (2002) Rôle des acides humiques dans le transfert du pyrène entre les minéraux argileux et l'eau. *Rev Sci Eau* 15:95–108.
- Farwell A, Nero V, Croft M, Bal P, Dixon DG (2006) Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch Environ Contam Toxicol* 51:600–607.
- Feiler U, Höss S, Ahlf W, Gilberg D, Hammers-Wirtz M, Hollert H, Meller M, Neumann-Hensel H, Ottermanns R, Seiler T-B, Spira D, Heininger P (2013) Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters. *Environ Toxicol Chem* 32:144–155.
- Frayse B, Mons R, Garric J (2006) Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:253–267. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.015
- Gerlai R (2011) A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. *Rev Neurosci* 22:3–4.
- Gilliers C, Le Pape O, Désaunay Y, Morin J, Guérault D, Amara R (2006) Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuar Coast Shelf Sci* 69:96–106.
- Di Giulio RT, Hinton DE (2008) The toxicology of fishes, CRC Press. 29:1101.
- Gonçalves R, Scholze M, Ferreira AM, Martins M, Correia AD (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ Res* 108:205–213.
- Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A, Akkanen J, Slootweg T, Mäenpää K, Agbo S, Gallampois C, Kukkonen JVK (2012) Bioavailability of Organic Contaminants in Freshwater Environments. *The Handbook Environ Chem*, Berlin, Heidelberg, pp 53.

- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C (1999) Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 45:147–158.
- Halder M, Léonard M, Iguchi T, Oris JT, Ryder K, Belanger SE, Braunbeck T a, Embry MR, Whale G, Norberg-King T, Lillicrap A (2010) Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integrated Environ Assess Manag* 6:484–491.
- Heintz RA, Rice SD, Wertheimer AC, Bradshaw RF, Thrower FP, Joyce JE, Short JW (2000) Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Mar Ecol Prog Ser* 208:205–216.
- Hengstler JG, Foth H, Kahl R, Kramer P, Lilienblum W, Schulz T, Schweinfurth H (2006) The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicol* 220:232–239.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86:6–19.
- Hollert H, Dürr M, Erdinger L, Braunbeck T (2000) Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the neckar river (Germany) during a winter flood. *Envir Toxicol Chem* 19:528–534.
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Soils Sediments* 3:197–207.
- Höss S, Ahlf W, Fahnenstich C, Gilberg D, Hollert H, Melbye K, Meller M, Hammers-Wirtz M, Heininger P, Neumann-Hensel H, Ottermanns R, Ratte H-T, Seiler T-B, Spira D, Weber J, Feiler U (2010) Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination--determination of toxicity thresholds. *Environ Pollut* 158:2999–3010.
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precedes morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:191–205.
- Incardona JP, Linbo TL, Scholz NL (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol Appl Pharmacol* 257:242–249.
- van der Jagt K, Munn S, Torslov J, de Bruijn J (2004) Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Addendum to the report of the European Commission: Assessment of additional testing needs under REACH effects of (Q)SARS, risk based testing and voluntary industry initiatives 1–85.
- Kerambrun E, Henry F, Perrichon P, Courcot L, Meziane T, Spilmont N, Amara R (2012) Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: Effects of metallic and organic compounds. *Aquat Toxicol* 108:130–140.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dynam* 203:253–310.

- Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, Cheung CYJ, Mateus R, Healey D, Kim S, Werdich A a, Haggarty SJ, Macrae C a, Shoichet B, Peterson RT (2010) Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat Chem Biol* 6:231–237.
- Kosmehl T, Hallare A V, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2006) A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem* 25:2097–2106.
- Kosmehl T, Krebs F, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2007) Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with zebrafish embryos. *J Soils Sediments* 7:377–387.
- Köthe H (2003) Existing Sediment Management Guidelines : An Overview What will happen with the sediment / dredged material ? *J Soils Sediments* 3:139–143.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol Part C, Pharmacol, Toxicol Endocrinol* 149:196–209.
- Landrum PF, Lotufo GR, Gossiaux DC, Gedeon ML, Lee J-H (2003) Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia spp*: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. *Chemosphere* 51:481–489.
- Laor Y, Farmer WJ, Aochi Y, Strom PF (1998) Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. *Water Res* 32:1923–1931.
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269:1–20.
- Le Bihanic F, Perrichon P, Landi L, Clérandeau C, Le Menach K, Cousin X, Cachot J (in press) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environ Sci Pollut Res*.
- Linney E, Upchurch L, Donerly S (2004) Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol* 26:709–718.
- Lockwood B, Bjerke S, Kobayashi K, Guo S (2004) Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacol Biochem Behav* 77:647–654.
- MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicol* 30:52–58.
- Mayer P, Fernqvist MM, Christensen PS, Karlson U, Trapp S (2007) Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environ Sci Technol* 41:6148–6155.
- McGurk MD, Brown ED (1996) Egg-larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound , Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Can J Fish Aquat Sci* 55:2343–2354.
- Muhling BA, Roffer MA, Lamkin JT, Ingram GW, Upton MA, Gawlikowski G, Muller-Karger F, Habtes S, Richards WJ (2012) Overlap between Atlantic bluefin tuna spawning grounds and observed Deepwater Horizon surface oil in the northern Gulf of Mexico. *Mar Pollut Bull* 64:679–687.

- Nagel R (2002) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38–48.
- Noury P, Geffard O, Tutundjian R, Garric J, Ecotoxicologie L (2006) Non Destructive In Vivo Measurement of Ethoxyresorufin Biotransformation by Zebrafish Prolarva: Development and Application. *Environ Toxicol* 324–331.
- OECD (1998). Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 212: Fish, Short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages. 1–20.
- OECD (2004). Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 218: Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. 1–21.
- OECD (2013a). Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 210: Fish, early-life stage toxicity test. 1–18.
- OECD (2013b). Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 236: Fish, Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 1–22.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149.
- Otte JC, Schmidt AD, Hollert H, Braunbeck T (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 100:38–50.
- Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K, Au DWT (2009) Use of medaka in toxicity testing. *Curr Protoc Toxicol*. pp 1–36
- Padilla S, Hunter DL, Padnos B, Frady S, MacPhail RC (2011) Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol Teratol* 33:624–630.
- Péan S, Daouk T, Vignet C, Lyphout L, Leguay D, Loizeau V, Bégout M-L, Cousin X (2013) Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicol Teratol* 39:45–56.
- Rihel J, Prober D, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, Haggarty SJ, Kokel D, Rubin LL, Peterson RT, Schier AF (2010) Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* 327:348–351.
- Russell WMS, Burch RL (1959) The Principles of humane experimental technique. 1–5.
- Schneider C a, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.
- Scott J, Incardona JP, Pelkki K, Shepardson S, Hodson P V (2011) AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquat Toxicol* 101:165–174.
- Shen H, Huang Y, Wang R, Zhu D, Li W, Shen G, Wang B, Zhang Y, Chen Y, Lu Y, Chen H, Li T, Sun K, Li B, Liu W, Liu J, Tao S (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environ Sci Technol* 47:6415–6424.

- Spitsbergen J, Kent M (2003) The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations. *Toxicol Pathol* 31:62–87.
- Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, Schumacher A, Selderslaghs I, Weiss C, Witters H, Braunbeck T (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33:128–132.
- Van Tiem LA, Di Giulio RT (2011) AHR2 knockdown prevents PAH-mediated cardiac toxicity and XRE- and ARE-associated gene induction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol* 254:280–287.
- Usenko CY, Robinson EM, Usenko S, Brooks BW, Bruce ED (2011) PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 30:1865–1872.
- Varanasi U, Reichert WL, Stein JE, Brown DW, Sanborn HR (1985) Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ Sci Technol* 19:836–841.
- Vicquelin L, Leray-Forget J, Peluhet L, LeMenach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat Toxicol* 105:235–245.
- Voelker D, Vess C, Tillmann M, Nagel R, Otto GW, Geisler R, Schirmer K, Scholz S (2007) Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquat Toxicol* 81:355–364.
- Wessel N, Ménard D, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, Le Goff J, Burgeot T, Akcha F (2012) Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Aquat Toxicol* 108:33–41.
- Wessel N, Ollivier H, Goff J Le, Burgeot T (2010) The toxicity of benzo [a] pyrene on sole (*Solea Solea*) hepatocytes : assessment of genotoxic and enzymatic effects. *Polycycl Aromat Comp* 30:346–354.
- Willett K, Steinberg M, Thomsen J, Narasimhan TR, Safe S, McDonald S, Beatty K, Kennicutt MC (1995) Exposure of killifish to benzo[a]pyrene: comparative metabolism , DNA adduct formation and aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonist activities. *Comp Biochem Physiol* 112B:93–103.
- Willett KL, Randerath K, Zhou GD, Safe SH (1998) Inhibition of CYP1A1-dependent activity by the polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene. *Biochem Pharmacol* 55:831–839.
- Willett KL, Wassenberg D, Lienesch L, Reichert W, Di Giulio RT (2001) In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in *Fundulus heteroclitus* by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Toxicol Appl Pharmacol* 177:264–271.
- Wölz J, Cofalla C, Hudjetz S, Roger S, Brinkmann M, Schmidt B, Schäffer A, Kammann U, Lennartz G, Hecker M, Schüttrumpf H, Hollert H (2009) In search for the ecological and toxicological relevance of sediment re-mobilisation and transport during flood events. *J Soils Sediments* 9:1–5.

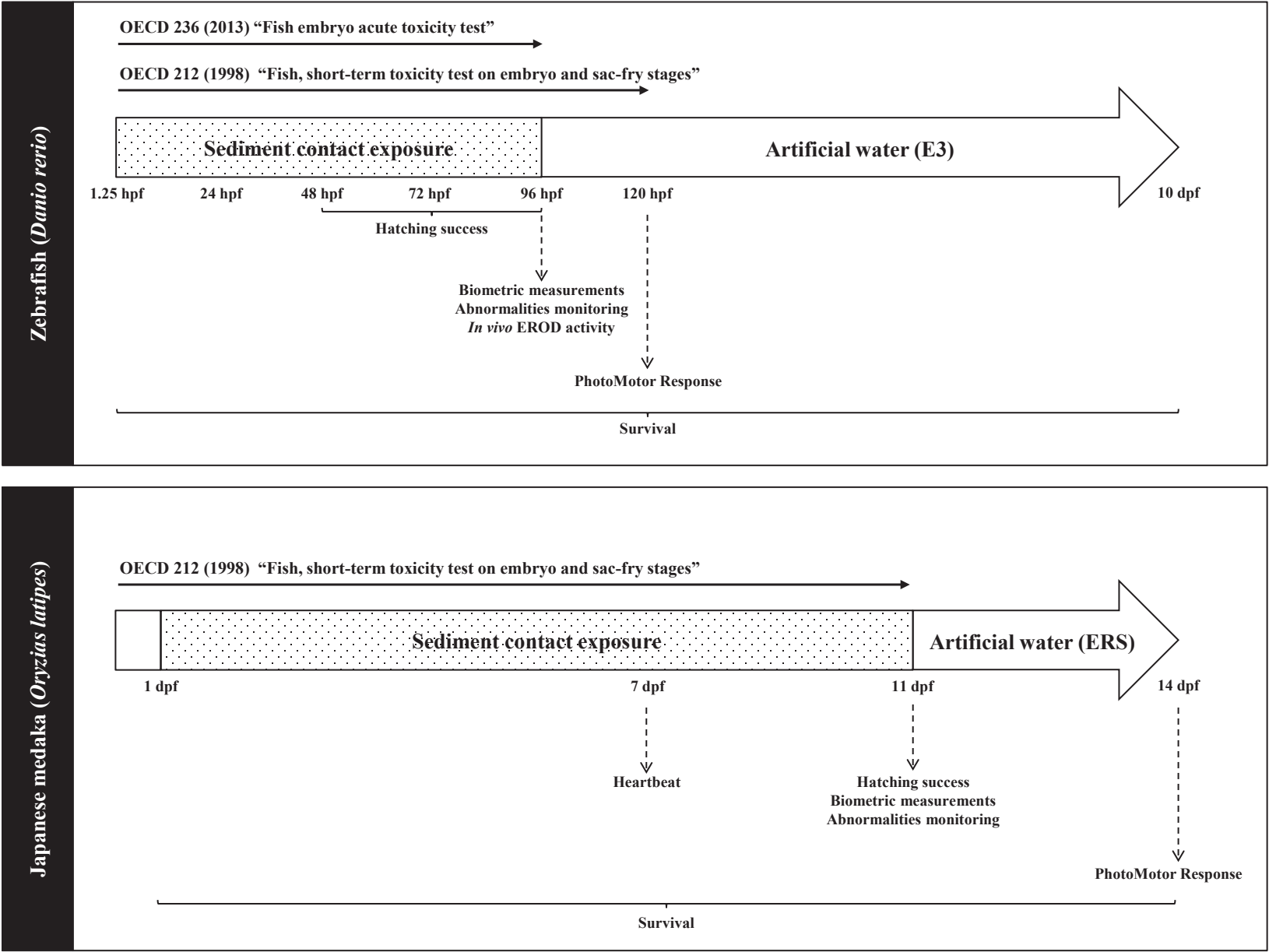


Fig. 1 Supplementary data Experimental design of zebrafish and medaka embryo-larval assays

Table 1 Supplementary data PAH-tested concentrations in spiked sediments

PAHs	Peat concentration (%)	Target concentration (ng.g ⁻¹ dw)	Measured concentration (ng.g ⁻¹ dw)	Spiking efficiency (%)
BaP	0 %	10000	1655	17
	2.5 %	10000	1736	18
	5 %	10000	1969	20
Fluo	0 %	10000	6321	63
	2.5 %	10000	5912	59
	5 %	10000	4396	44

2.2.5 Article n°3 : Mise au point de nouveaux marqueurs de toxicité sur embryons et larves de médaka

De même que pour l'article n° 1, l'article n° 3 s'inscrit dans le développement et l'amélioration des outils méthodologiques du MELAc. Une fois la matrice d'exposition mise au point, de nouveaux marqueurs de toxicité permettraient d'élargir le degré de sensibilité et le spectre d'effets observés du bioessai. Ainsi, cet article propose une évaluation de deux nouveaux paramètres par rapport aux paramètres déjà couramment utilisés : les tests de micronoyaux (MN) et de locomotion sur larves de médaka japonais. En effet de nombreux contaminants aquatiques provoquent des dommages à l'ADN chez les SPD de poissons. Récemment, le test des comètes a été développé sur larves entières de médaka japonais afin d'évaluer les dommages réparables de l'ADN (Morin et al. 2011). De manière complémentaire, le test MN sur larves entières de médaka est proposé dans ce travail, afin de détecter les dommages de l'ADN non-réparables. Contrairement à la majorité des tests MN communément réalisés sur érythrocytes, ce protocole intègre la réponse de tous les types cellulaires présents dans l'organisme. Il permet une détection précoce des dommages à l'ADN irréversibles et, de ce fait, une vision globale des dommages accumulés tout au long du développement embryonnaire. D'autre part, la législation européenne recommande l'évaluation du pouvoir neurotoxique des contaminants sur l'activité motrice des individus exposés (OCDE 2007). Les tests de locomotion sur larves de poissons présentent l'avantage d'intégrer diverses réponses de l'organisme aux composés toxiques telles que des perturbations du système nerveux central et des défaillances visuelles ou morphologiques. Le test de locomotion présenté dans cette étude consiste en un suivi vidéo de l'activité natatoire des larves de médaka confrontées à des périodes de lumière et d'obscurité alternées. Puisque le benzo[a]anthracène (BaA) est un HAP largement représenté dans les écosystèmes aquatiques et que sa toxicité présente des lacunes dans la littérature, ce composé a été utilisé comme polluant aquatique d'étude.

Après l'exposition par sédiment contact des embryons au BaA, les individus ont présenté une tachycardie, des malformations morphologiques (en particulier cranio-faciales), une diminution de l'activité natatoire, ainsi qu'une augmentation de la fréquence de cellules MN. Ces quatre paramètres n'ont pas suivi le modèle classique de dose-réponse pour lequel l'effet toxique augmente avec l'augmentation de la concentration en contaminant. De plus, l'analyse de corrélation de Spearman a révélé que l'activité natatoire des larves était anti-corrélée aux taux de malformations et d'induction de cellules MN. A savoir, plus une larve a exhibé de malformations, ou des dommages à l'ADN irréversibles, plus la larve a présenté un comportement léthargique. La plus faible concentration induisant un effet observé (LOEC) s'est avéré être la plus faible concentration testée, équivalente à $0,92 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. de BaA, et ceci pour 3 paramètres : malformations observées, test MN et test de locomotion. Cette concentration embryotoxique pour les stades précoces de développement du médaka japonais est comparable à celles détectées dans l'environnement. Jusqu'à $43 \mu\text{g.g}^{-1}$ de BaA ont été détectés dans le Nord-ouest de l'océan pacifique et entre $1,1$ et $1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ dans le sédiment de l'estuaire de Seine (Barbee et al. 2008, Cachot et al. 2006). Ce composé représente donc un risque majeur pour les populations de poissons dont la survie dépend de la qualité du sédiment. Les deux nouveaux marqueurs de toxicité développés dans cette étude se sont donc révélés aussi sensibles que le taux de larves malformées. Ils peuvent être utilisés pour l'étude du mode d'action ou de la toxicité de nouvelles substances toxiques ou d'échantillons environnementaux. C'est pourquoi il est tout à fait réalisable de les inclure dans le protocole existant du test MELAc.

A notre connaissance, ce travail est le premier décrivant un protocole pour évaluer la fréquence de cellules micronuclées et l'activité natatoire des larves de médaka japonais. Par

ailleurs, en tant qu'objectif éthique pour la santé et le bien-être des animaux, ces tests sont conduits au stade de prolarve (non-considéré par la législation européenne sur l'expérimentation animale) et le nombre d'individus requis est réduit. Pour ces raisons, ces protocoles satisfont les conditions réclamées par les lois sur l'expérimentation animale pour l'évaluation des substances chimiques (EC 2006).

ARTICLE III

Le Bihanic F, Sommard V, Pichon A, Grasset J, Berrada S, Budzinski H, Cousin X, Morin B, Cachot J, Combined bioassays in Japanese medaka embryos for integrative toxicity assessments of pollutants accumulated in sediments: application to benz[a]anthracene. *En préparation*.

Combined bioassays in Japanese medaka embryos for integrative toxicity assessments of pollutants accumulated in sediments: application to benz[a]anthracene

Le Bihanic Florane^a, Somnard Vivien^a, Pichon Anaïk^a, Grasset Julie^a †, Berrada Saadia^b, Budzinski H      ^a, Cousin Xavier^{cd}, Morin B        ^a, Cachot J      ^a *

^aUniversity of Bordeaux, EPOC, UMR CNRS 5805, 33405 Talence, France

^bAtoxigen laboratory, 33600 Pessac, France

^cIFREMER, Ecotoxicology laboratory, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

^dINRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Abstract

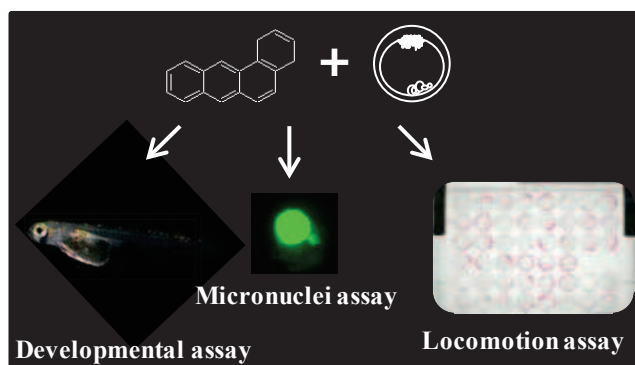
Benz[a]anthracene (BaA) is a ubiquitous polycyclic aromatic hydrocarbon found in numerous aquatic ecosystems. However there is scarce data available on the toxicity of this compound to aquatic organisms. To address this lack, the medaka embryo larval sediment contact assay (MELAc) was performed, incubating Japanese medaka embryos onto BaA-spiked artificial sediment. Besides current survival and developmental criteria, two new integrative assays were evaluated to improve the sensitivity and the spectrum of effects measured with the MELAc: the micronucleus and the locomotion assays on prolarvae. Firstly, the micronucleus assay performed on the entire Japanese medaka larvae revealed an increased frequency of micronucleated cells in larvae exposed from 0.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw of BaA. Contrary to the majority of fish micronucleus assays performed on a single cell type, this method gives an overview of early non-repairable DNA damage accumulated throughout the whole period of embryonic development. Secondly, the locomotion assay performed on newly hatched larvae highlighted significantly reduced swimming activity in BaA-exposed larvae. BaA exposed fish also exhibit significant tachycardia and craniofacial abnormalities. BaA was shown to induce adverse effects in fish early life stages at concentrations that occur in aquatic environments. Taking these results into consideration, BaA could represent a threat for aquatic species living in close proximity to sediments.

Keywords: Hydrophobic pollutants toxicity; sediment quality; embryotoxicity; teratogenicity; DNA damage; swimming behavior

Abbreviations: PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; BaA: benz[a]anthracene; MN: micronucleus; CP: cyclophosphamide; MELAc: medaka embryo-larval assay by sediment contact; ELS: early life stages; dw: dry weight; dpf: days post fertilization; dph: days post hatching, ERS: egg rearing solution; FBS: fetal bovine serum; LOEC: lowest observed effect concentration.

*Corresponding Author: J       Cachot, UMR 5805 EPOC, University of Bordeaux, 351 cours de la lib        , 33405 Talence Cedex, France. j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr

              : Julie Grasset, INRS ETE, Qu      , QC G1K 9A9, Canada



Graphical abstract

Introduction

Numerous hydrophobic pollutants are directly discharged into aquatic environments or via atmospheric particle deposition. These pollutants are mostly transported sorbed onto suspended particulate matter and tend to be accumulated over time in sediments. Although not water soluble, these major aquatic pollutants can represent a threat for aquatic organisms since they are generally persistent and can be bioaccumulated in invertebrates or through the entire food chain. Among those pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are omnipresent in aquatic ecosystems (Cachot et al. 2006, Gao et al. in press, Gaspard et al. 2009). Fish larvae growing in PAH contaminated areas have been shown to exhibit developmental defects and a reduction in species recruitment (Barbee et al. 2008, Norcross et al. 1996). Benz[a]anthracene is a highly hydrophobic PAH congener ($\log K_{ow} = 5.6 - 5.9$) with high sorption capacity on particle and organic matter. It is accumulated in sediments all around the world and it accounts for up to 10 % of the total content of PAH (Table 1). BaA is considered as a priority substance by the US EPA but there is an evident lack of ecotoxicological data about this compound in the scientific literature. To fill this gap, the present research aims to assess the toxicity of BaA to aquatic organisms. A fish embryo-larval assay was used as a model toxicity assay for its relevance to the evaluation of risk substances (Belanger et al. 2010, Embry et al. 2010). Fish embryo-larval assays present numerous advantages in terms of cost, ethical acceptability and experimental sensitivity. The medaka embryo larval assay (MELA) was initially developed for chemical testing of water-soluble compounds (Helmstetter and Alden 1995). To better simulate fish early life stages exposure to hydrophobic organic compounds bound to particles, a sediment-contact assay was specifically developed using embryos of Japanese medaka (Cachot et al. 2007, Le Bihanic et al. submitted). This assay, named MELAc, consists of incubating medaka embryos onto artificially-contaminated sediments in controlled conditions from the fertilization stage until hatching. Several endpoints including survival, hatching success, hatching time, cardiac activity, biometry and developmental abnormalities are recorded during the assay at embryonic and larval stages before yolk-sac resorption. The sensitivity of the MELAc and the range of effects detected can be improved by adding two new assays within the same experiment, the micronucleus (MN) and the locomotion assays.

The comet assay was recently adapted for *Oryzias latipes* to detect repairable DNA damage in the whole body of the larvae (Morin et al. 2011). The MN assay is proposed in the present study as a complementary approach to the comet assay by detecting non repairable DNA damage, as clastogenic and aneugenic effects. The method consists of scoring micronuclei in cells formed by condensation of acentric chromosomal fragments or whole chromosomes that

are not included into daughter nuclei at mitosis because of a lack of centromere, damage or defects in cytokinesis (Al-Sabti and Metcalfe 1995). However, the fish MN assay is commonly performed on erythrocytes to assess the genotoxicity of chemicals or environmental samples (Çavas 2008, Liu et al. 2013, Rocha et al. 2009, Rodriguez-Cea et al. 2003). In this study we propose a new integrative MN assay performed on cells from the whole body of the medaka larvae. Furthermore, regulators recommend assessment of chemical neurotoxicity including motor activity. The locomotion assay presented in this work consisted of video tracking the swimming activity of medaka larvae alternately in dark and light periods. This challenge has been described as a visual motor response assay (Emran et al. 2008).

Table 1. Worldwide BaA sediment concentrations

	[BaA] ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)	[BaA]/[Σ PAH] (%)	References
<i>River</i>			
Pearl river (China/Hong Kong)	0.00 – 0.02	1 – 3	(Luo et al. 2006)
Seine river (France)	0.09 – 1.10	7 – 9	(Cachot et al. 2006)
Mersey river (United Kingdom)	0.04 – 0.30	6 – 10	(Vane et al. 2007)
Little egg estuary (NJ, USA)	0.00 – 0.82	3 – 7	(Vane et al. 2008)
Lenga river (Chili)	0.02 – 0.43	6 – 8	(Pozo et al. 2011)
Scheldt river (France/Belgium)	0.77 – 1.45	-	(Gao et al. <i>in press</i>)
<i>Coastal area</i>			
Black Sea (Ukraine-Turkey-Russia)	0.00 – 0.05	0 – 9	(Readman et al. 2002)
Dar es Salaam (Tanzania)	0.03 – 1.00	2 – 4	(Gaspere et al. 2009)
<i>Lake</i>			
Lake Superior (Canada/USA)	0.03 – 0.04	3 – 5	(Baker et al. 1991)
European lakes	> 0.001	1 – 2	(Vives et al. 2004)
Pacific Northwest (USA)	2 – 43	5 – 6	(Barbee et al. 2008)

Material and methods

Chemicals

Sigma-Aldrich supplied the benz[a]anthracene (BaA) and ethyl 4-aminobenzoate as well as the acridine orange stain (St Quentin Fallavier, France). Acros Organics (Thermo fisher Scientific, Geel, Belgium) supplied the dichloromethane. Cyclophosphamide monohydrate (CP) was purchased from Thermo Fischer Scientific (AC20396, Acros organics, Noisy Le Grand, France).

Exposure design

The MELAc was performed as previously described (Le Bihanic et al. submitted). Gis-Amagen (INRA, Jouy-en-Josas, France) provided eggs at the early gastrula stage 14-15 (Iwamatsu 2004). Exposure consisted of depositing fertilized eggs in a Nitex® thermoformed basket onto the surface of the sediment at 1 day post fertilization (dpf). Exposure units, replicated 3 times per treatment, involved 25 embryos, 3 g dw of sediment and 3 mL of Egg Rearing Solution (ERS: 1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl₂ and 0.163 MgSO₄ in 1 L Milli-Q autoclaved water). Experiments were performed at 26 ± 0.3 °C in a thermoregulated chamber (Snijders Scientific, Netherlands) with a photoperiod light : dark 12:12, 5000 lx white light. Oxygen was monitored daily just before ERS medium renewal. At hatching, pro-larvae were photographed under a stereomicroscope (MZ75, Leica Microsystems, Nanterre, France) for morphometric analyses and then transferred into a glass beaker containing 20 mL of mixed water (dechlorinated tap water mixed with distilled water 1:2 v/v aerated for 24 h). At the end of the exposure (10 dpf), non-hatched embryos were transferred until hatching into new plastic Petri dishes containing 3 mL ERS without sediment. At 15 dpf, the experiment was stopped by euthanizing all living pro-larvae with a lethal dose of 120 mg L⁻¹ Ethyl 4-aminobenzoate (Benzocaine). Pro-larvae were not fed during the experiment.

Artificial sediment containing 2.5 % dw of blond peat, 5 % dw of kaolin clay and 92.5 % dw of sand was prepared as previously reported (Le Bihanic et al. submitted), and then spiked with 4 concentrations of BaA: 1, 3, 10 and 30 µg g⁻¹ dw (nominal concentrations). The concentrations tested were in the range of environmental PAH concentrations found in sediments worldwide (Table 1). The control sediment was spiked with dichloromethane solvent only. 60 mL of dichloromethane was added to 30 g of artificial sediment in a 250 mL glass balloon. The solvent was evaporated with a rotary evaporator Rotavapor (IKA, Staufen, Germany) at 115 rpm, at 45 °C, for 50 to 60 min. To ensure complete elimination of any residual solvent, spiked sediments were stored overnight at room temperature, in the dark under a fume hood. Sediment samples were stored at -20 °C before analysis.

Chemical analyses

For measurement of BaA in sediments, chrysene d12 was added prior to extraction as an internal deuterated standard. Pyrene d10 and benzo[b]fluoranthene d12 were both added as syringe standards before the injection. The extraction method used has been previously described by Budzinski et al. (2000). BaA concentrations were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (Baumard et al. 1999). Extraction efficiencies were satisfactory, equivalent on average to 78 %. The entire analytical procedure was applied several times to the certified marine sediment SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Extraction blanks were run for each series of samples.

Embryotoxicity assay

Heartbeat measurements were processed in 7 dpf embryos at 23 ± 1 °C under stereomicroscope (MZ75, Leica) using a cold light source (Intralux® 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland). Heartbeat was counted over 3 periods of 20 seconds from the same embryo, using 5 embryos per replicate. Values were summed to obtain beat min⁻¹ data for each individual embryo. At hatching, 15 larvae per replicate were photographed with a stereomicroscope equipped with an image analysis system to record morphological

abnormalities, as well as head and body length (CCD camera DFP420C Leica, Nanterre, France). The yolk-sac area was measured on the side-larvae picture. Morphological abnormalities, e.g. spinal, craniofacial, ocular and cardiac anomalies and edemas, were expressed in percentage terms relating to the number of individuals.

Micronucleus assay

The MN assay was performed on 15 dpf pro-larvae. Cells were isolated following the method of Morin et al. (Morin et al. 2011) with some modifications. Optimizations mainly consisted of determination of the minimum number of larvae required, slides coloration (Wright® or Acridine orange staining) and KCl or fetal bovine serum (FBS) treatments to improve cell reading. Because of the large amounts of cell loss or damage, KCl and FBS treatments were discontinued (data not shown). Seven larvae per replicate were fully minced with razor blades. Minced larvae were then digested with 1.25 mg mL⁻¹ dispase II from *Bacillus polymyxa* (Roche, Meylan, France) in minimum essential medium eagle (MEM, St Quentin Fallavier, France) at 37 °C, for 45 min, under agitation (150 rpm). After centrifugation (1000 rpm, 10 min, room temperature), pellets were rinsed in 80 µL of MEM. Cell concentration and viability were then assessed. Average cell viability was equivalent to 98 %. After a further centrifugation (1000 rpm, 10 min, room temperature) pelleted cells were fixed in a mixed solution of acetic acid and methanol 1:4 v:v for 10 min. Cell suspensions were then smeared onto slides, and these were dried for 24 h at room temperature. Just before reading, slides were stained with 40 µL acridine orange solution (0,003 % in PBS) and covered with a glass slip. Acridine orange staining was preferred to Wright staining because it guarantees DNA-specific staining and thus minimizes artifact MN occurrence (Polard et al. 2011). Reading was processed using an epi-fluorescent microscope at X400 magnification (Olympus, Rungis, France). Micronucleated cell frequency was manually recorded from 1000 cells per slide using blind review by a single observer. A cell was considered micronucleated if the MN was round shaped, distinct from main nucleus, its size was inferior to a third of the main nucleus, and with a similar green staining to the main nucleus (Hayashi et al. 1998). Non-isolated, stacked, more than bi-nucleated or orange-red stained cells were not taken into account.

As a positive control, one dph Japanese medaka were exposed for 72 h to 5 mg L⁻¹ of water-borne Cyclophosphamide (CP). Exposure was performed in 12-well microplates (Greiner, Courtaboeuf, France) with 6 larvae per well, using three wells per condition for control and CP treatments. Pro-larvae were not fed during the experiment. No mortality was observed during the exposure.

This MN assay performed on the whole body of larvae and used in the present study is under the rights of the French patent No.1058505 established 19/10/2010.

Locomotion assay

The locomotion assay consisted of a light stimulus response measured on 6 larvae per replicate condition at 14 dpf based on a published method (Emran et al. 2008, MacPhail et al. 2009) with modifications. Larvae were randomly selected and placed into a 48-well microplate. In preliminary experiments (unpublished data), it was shown that Japanese medaka larvae could swim for longer distances in a 48-well microplate than in a 96-well microplate. Conversely, there was no significant difference between 48-well and 24-well microplates. Therefore, 48-well microplates were selected as suitable well size for this assay. Each well of the microplate contained 1 larva in 500 µL of mixed water. Larvae were first

acclimatized for 2 h, in the dark, in a Daniovision chamber (Noldus, Wageningen, Netherlands). Next, larvae coordinates were recorded with an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) and an Ethovision 9.0 image analysis system (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Measurements were performed at 23 ± 1 °C during a 40 min period of analysis which included 2 cycles of 10 min in the dark, followed by 10 min in the light. A dynamic subtraction method was applied with a sampling rate of 25 images per sec, a dark contrast 16 - 255, current frame weight 4, subject size 2 - 12500, and no subject contour dilation. To reduce system noise, an input filter of minimal distance moved was set to 10 % of the total body larva equivalent to 0.4 mm. Velocity, distance swam and mobility were calculated for each larvae. Mobility refers to body movement, which can be independent of spatial displacement e.g. an axial rotation. Each parameter was expressed as mean duration (or percentage) for each 10 min dark or light period. All microplates were analyzed with identical temperature, detection and acquisition settings. Larvae unable to swim because of severe morphological abnormalities were not used for the locomotion assay.

Statistical analysis

Each condition was identically replicated 3 times. Each replicate was considered as an independent sample. Normality of the data distribution was verified on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.01$). Variance homogeneity was evaluated using the Levene test ($p < 0.05$). Variance was homogenous and data had a normal distribution, thus Anova analysis was performed, followed by the Tukey post-hoc test ($p < 0.05$). Spearman's correlation coefficient was calculated to assess the strength of the relation between the different endpoints studied. Statistical analyses were performed with Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Data is indicated as mean \pm SD.

Results

Embryo-larval assay

BaA spiking efficiencies yielded between 41 and 92 % and decreased globally with BaA concentration (Table 2). Dissolved oxygen concentration was on average above 82 % for all exposure conditions. Embryo-larval survival was above 89 % in the control, and in all BaA treatments indicating no lethal effects up to $12.2 \mu\text{g g}^{-1}$ dw of sediment. No effect from BaA was noted in terms of hatching rate or time taken to hatch. More than 85 % of embryos from each treatment hatched after around 12 days of embryonic development. There was no difference in larvae biometry between treatments at hatching. Total larvae length was on average equivalent to 4.2 ± 0.1 mm, head length to 0.86 ± 0.02 mm, and yolk sac area to 0.38 ± 0.02 mm². However, BaA induced tachycardia in 7 dpf embryos that was significant for the highest tested concentration of $12.2 \mu\text{g g}^{-1}$ dw. BaA exposure also resulted in a significant enhancement of morphological abnormalities from $0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ BaA dw. The majority of the BaA-induced abnormalities were curvature of the spinal axis and cranio-facial deformities, including changes in jaw and skull shape. In contrast, peri-cardiac and yolk-sac edemas were relatively scarce.

Table 2. Developmental defects in Japanese medaka following embryos exposure to BaA-spiked sediments. Different letters refer to significant differences between treatments (mean \pm SD, N=3, Anova, $p < 0.05$).

BaA exposure (nominal concentrations $\mu\text{g g}^{-1}$ dw)	0	1	3	10	30
Measured concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)	< 0.2	0.917	2.332	5.082	12.154
spiking efficiencies (%)	-	92	78	51	41
Dissolved O_2 (average of exposure time %)	84.7 \pm 1.2	83.3 \pm 1.16	82.9 \pm 1.2	83.2 \pm 0.4	85.5 \pm 0.4
Embryonic survival (%)	89.2 \pm 8.3	92.0 \pm 6.5	94.4 \pm 5.5	95.9 \pm 0.1	94.5 \pm 5.0
Larval survival (%)	100.0 \pm 0.0	98.4 \pm 2.8	98.6 \pm 2.4	95.6 \pm 4.4	98.5 \pm 2.6
Hatching rate (%)	85.2 \pm 11.5	90.7 \pm 5.0	87.6 \pm 6.0	94.5 \pm 2.0	86.4 \pm 8.0
Embryonic heartbeat (beat/sec)	108\pm7.8^A	120\pm13.5^{AB}	113\pm2.1^A	121\pm8.6^{AB}	130\pm3.4^B
Time to hatch (days)	12.1 \pm 0.3	12.0 \pm 0.5	12.0 \pm 0.3	11.9 \pm 0.1	11.8 \pm 0.7
Larvae total length (mm)	4.28 \pm 0.04	4.31 \pm 0.03	4.27 \pm 0.04	4.18 \pm 0.06	4.17 \pm 0.09
Larvae head length (mm)	0.88 \pm 0.01	0.87 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01
Yolk sac area (mm ²)	0.39 \pm 0.01	0.39 \pm 0.02	0.38 \pm 0.01	0.36 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02
Abnormal larvae (%)	4.4\pm2.2^A	22.2\pm2.2^B	28.9\pm2.2^C	38.7\pm6.1^{BC}	30.3\pm1.9^{BC}
Spinal abnormalities (%)	2.2 \pm 3.9	11.1 \pm 7.7	18.6 \pm 17.9	15.6 \pm 3.9	13.7 \pm 6.2
Craniofacial abnormalities (%)	0.0\pm0.0^A	17.8\pm3.9^B	20.3\pm6.2^B	17.8\pm3.9^B	18.8\pm5.0^B
Ocular abnormalities (%)	2.2 \pm 3.9	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 6.7	0.0 \pm 0.0
Cardiac abnormalities (%)	2.2 \pm 3.9	2.2 \pm 3.9	11.4 \pm 4.2	8.9 \pm 7.7	4.4 \pm 3.9
Edema (%)	0.0 \pm 0.0	2.2 \pm 3.9	2.4 \pm 4.1	2.2 \pm 3.9	0.0 \pm 0.0

MN assay

Around 3 to 5 % micronucleated cells were recorded in the control treatments of both BaA and CP exposures (Fig. 1). CP treatment increased MN occurrence for up to 12 %. After embryonic exposure to BaA, micronucleated cell frequency significantly increased for 0.9 and 12.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw compared to the control treatment (Fig. 1). This effect was not significant for 2.3 and 5.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ BaA. BaA-exposed larvae exhibited between 7.3 and 10 % of micronucleated cells.

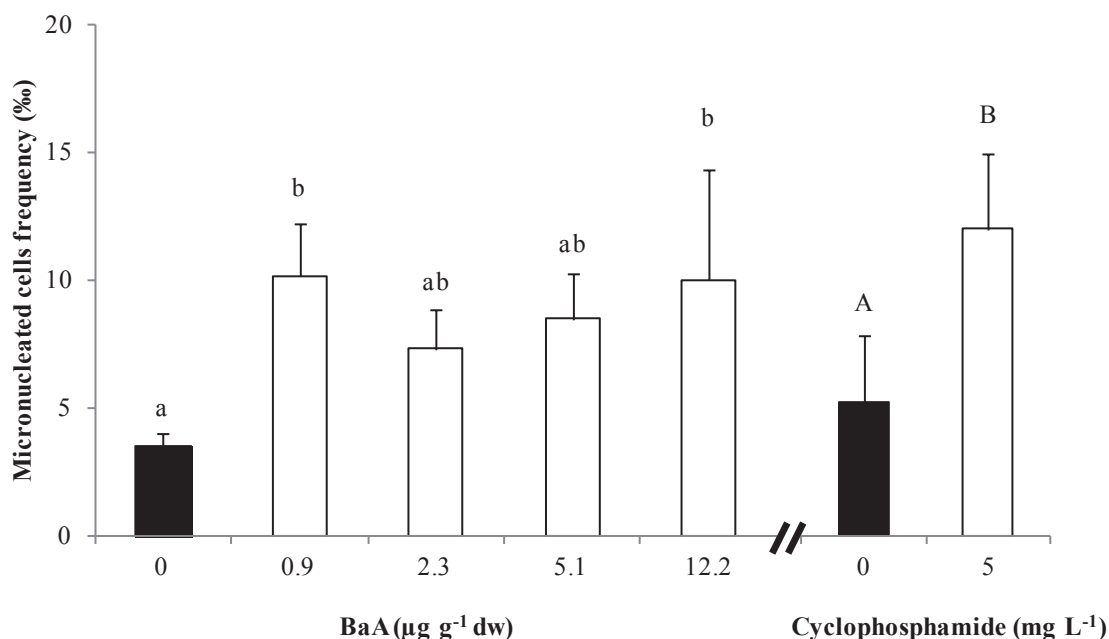


Figure 1. Micronucleated cells frequency recorded in isolated cells of whole body larvae. Individuals were exposed during all embryonic development to BaA spiked-sediment or during 72 h at larval stage to dissolved CP positive control. Different letters refer to statistical differences between treatments (Mean \pm SD, N = 3, Anova or Student's t-test, $p < 0.05$).

Locomotion assay

During the 40 min locomotion assay, a similar response pattern to light stimulation was observed for all examined larvae (Fig. 2). The first dark period (0 to 10 min) was characterized by larvae stabilization prior to the light challenge, with no statistical difference in larvae swimming activity (Fig. 3). During the following first light period (10 to 20 min), larvae activity increased linearly with time ($R^2 = 0.94$ at 0 $\mu\text{g g}^{-1}$; $R^2=0.79$ at 0.9 $\mu\text{g g}^{-1}$) but subsequently reacted with a 3 to 4-fold increase in velocity. During the following 10 min dark period (20 to 30 min), larvae velocity decreased. The light was turned on again at 30 min and their speed dropped down to about 1 mm s $^{-1}$, equivalent to the initial speed in the light at 10 min, and then increased again during the last 10 min of light (30 to 40 min) as observed during the previous light period. However, slopes were on average 1.7 fold steeper during the second light period (30 to 40 min) than during the first light period (10 to 20 min). Larvae swimming activity was markedly decreased after exposure to BaA in comparison to the control larvae (Fig. 3). Indeed, for the second light period (30 to 40 min), BaA-exposed larvae at all tested concentrations swam a total distance of 0.85 ± 0.07 m. This was significantly less

than the control larvae that swam 1.09 ± 0.04 m. Table 3 presents the differences in the intensity of larvae mobility: immobile, mobile or highly mobile. In accordance with the distance swam and velocity results, control larvae were significantly more highly mobile during the last light period (30 to 40 min) than larvae exposed to 2.3 and 12.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ BaA dw.

The distance larvae swam was significantly anti-correlated to MN cell frequency ($r = -0.66$, $p = 7.8 \times 10^{-3}$) and to abnormal larvae frequency ($r = -0.71$, $p = 3.2 \times 10^{-3}$). No correlation was observed when considering the other endpoints.

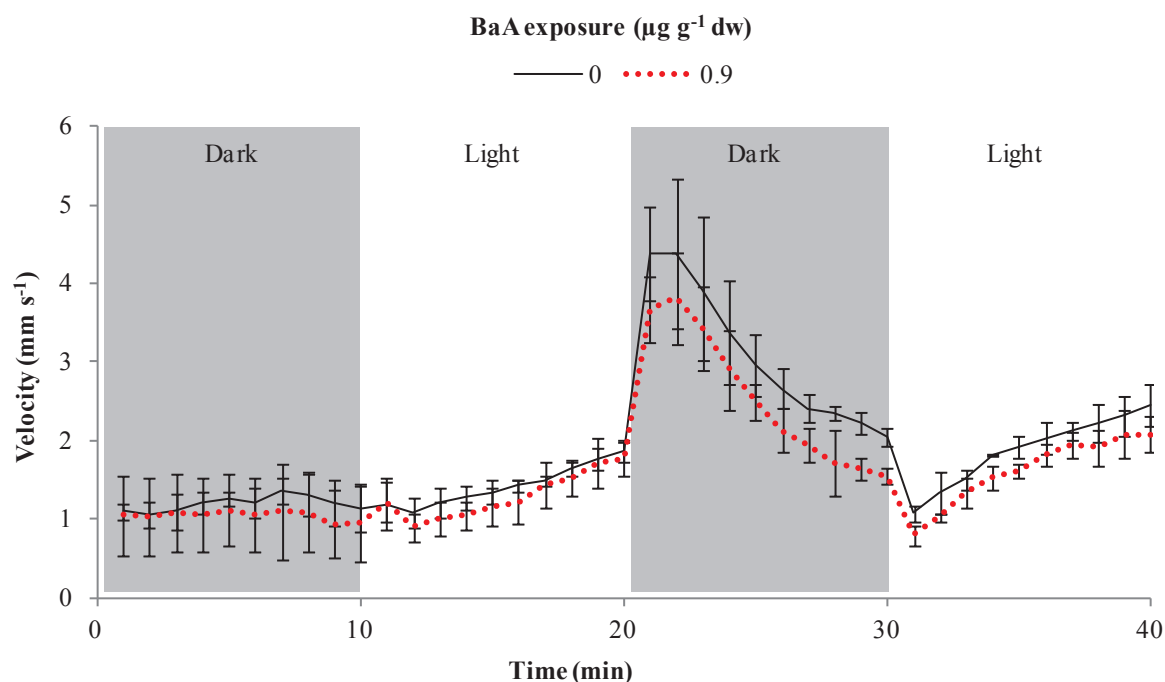


Figure 2. Velocity of Japanese medaka larvae following embryonic exposure to 0.92 $\mu\text{g g}^{-1}$ BaA dw. Velocity was recorded during a 40 min video tracked analysis: 10 min light + 10 min dark + 10 min light + 10 min dark. Data was averaged over each 1 min interval (Mean \pm SD, N = 3)

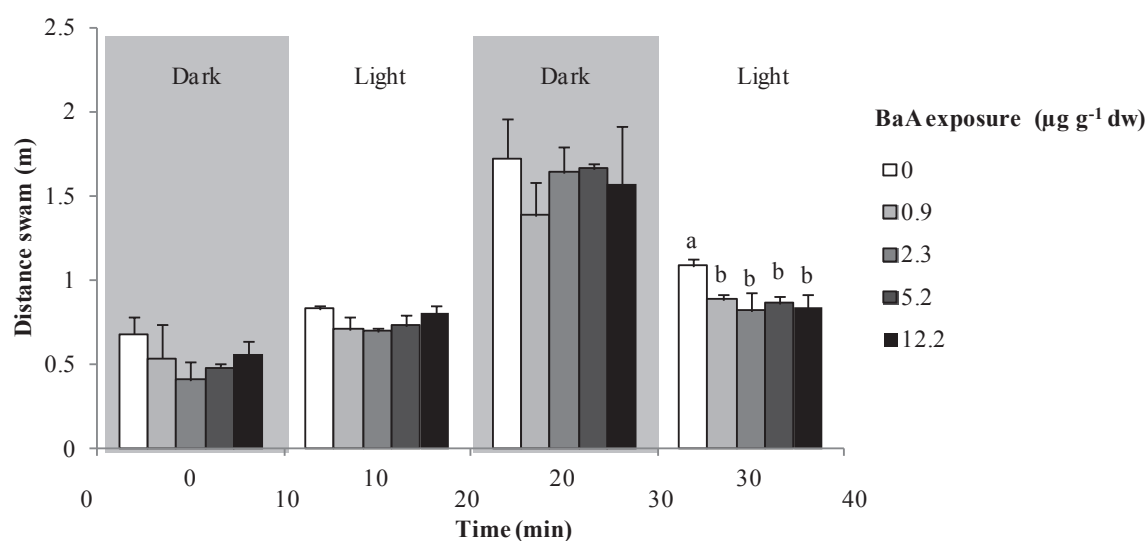


Figure 3. Distance swam of Japanese medaka larvae following embryonic exposure to BaA-spiked sediment. Distance swam was recorded during a 40 min video tracked analysis: 10 min light + 10 min dark + 10 min light + 10 min dark. Data was averaged over each 1 min interval. Different letters refer to statistical differences between treatments (Mean \pm SD, N = 3, Anova, $p < 0.05$).

Table 3. Japanese medaka larvae mobility after embryos exposure to BaA-spiked sediments. Values represent averaged mobility percentage over a 10 min time period. Different letters refer to significant differences between treatments (mean \pm SD, N=3, Anova, $p < 0.05$).

			BaA exposure (concentrations $\mu\text{g g}^{-1}$ dw)				
Time (min)			0	0.9	2.3	5.1	12.2
Immobile (%)	0 – 10	Dark	91.9 \pm 1.2	92.9 \pm 3.0	94.6 \pm 1.1	93.5 \pm 0.7	92.0 \pm 2.1
	10 – 20	Light	90.3 \pm 0.5	91.3 \pm 0.9	91.4 \pm 0.4	90.9 \pm 0.9	89.8 \pm 0.7
	20 – 30	Dark	79.5 \pm 1.8	82.1 \pm 2.2	79.5 \pm 0.5	78.7 \pm 0.8	79.8 \pm 2.4
	30 – 40	Light	87.3 \pm 0.2	89.0 \pm 0.3	89.7 \pm 1.1	89.2 \pm 0.4	89.2 \pm 1.6
Mobile (%)	0 – 10	Dark	3.1 \pm 0.4	2.9 \pm 0.8	2.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.1	3.2 \pm 0.7
	10 – 20	Light	4.8 \pm 0.2	4.4 \pm 0.7	4.3 \pm 0.1	4.6 \pm 0.5	4.9 \pm 0.5
	20 – 30	Dark	7.0 \pm 0.6	6.3 \pm 0.4	7.1 \pm 0.4	6.8 \pm 0.5	6.9 \pm 0.5
	30 – 40	Light	5.6 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3	4.8 \pm 0.5	5.1 \pm 0.7
Highly mobile (%)	0 – 10	Dark	5.0 \pm 0.8	4.2 \pm 2.3	3.0 \pm 0.9	4.0 \pm 0.5	4.9 \pm 1.4
	10 – 20	Light	4.9 \pm 0.6	4.3 \pm 0.4	4.2 \pm 0.3	4.5 \pm 0.5	5.3 \pm 0.7
	20 – 30	Dark	13.5 \pm 1.4	11.6 \pm 2.3	13.4 \pm 0.4	14.6 \pm 1.2	13.3 \pm 1.9
	30 – 40	Light	7.1\pm0.3^A	5.9\pm0.5^{AB}	5.5\pm0.8^B	5.9\pm0.1^{AB}	5.7\pm1.3^B

Discussion

Embryonic and larval survivals in the control condition were above 89 %. Furthermore, the measured oxygen saturation was on average between 83 and 100 % throughout the test. Thus these experiments complied with the OECD testing guidelines for fish early life stage toxicity tests (OECD 1992).

Toxic effects of BaA

At environmental concentrations, BaA induced developmental toxicity in Japanese medaka early life stages. Our findings surrounding BaA teratogenicity and cardiovascular toxicity are in agreement with developmental abnormalities and cardiac dysfunction reported by Incardona et al. (2006). Indeed, after zebrafish embryos exposure to BaA, the authors observed defects in cardiac function: pericardial edema, hemorrhage, failure in cardiac looping, degeneration of cardiomyocytes; as well as morphogenesis disruption: spinal curvature, yolk sac edema and reduced biometry. The cardiotoxicity of BaA was reported to be related to aryl hydrocarbon receptor AHR2 activation, but was shown to be independent of CYP1A induction.

Environmental concentrations of BaA were also shown to impair the swimming performance of fish ELS, in particular, under challenging conditions. Multiple morphological and physiological defects in muscle, skeleton, cardio-vascular, or neuro-sensorial systems can be the cause for this altered swimming activity. This result is in accordance with recent work reporting lethargy and abnormal swimming in juvenile fish exposed to 2, 3 or 4 aromatic ring PAHs (Gonçalves et al. 2008, Oliveira et al. 2012). Alteration of swimming performance can have severe consequences at later developmental stages, such as impairment of exogenous feeding or failure to escape predators (Couillard et al. 2011).

Finally, BaA was shown to induce DNA damage in fish ELS. In fact, BaA genotoxicity has already been shown in vitro using, either the SOS Chromotest (Mersch-Sundermann et al. 1992), or the Salmonella tiphimurium assay after bioactivation with S9 mix (Kido et al. 2013). Warshawsky et al. (1995) also documented MN induction in BaA-exposed human lymphocytes. However, to our knowledge, this is the first report on the genotoxic effects of BaA in fish.

In our study, disruption of fish swimming activity was correlated to DNA damage and frequency of abnormal larvae. These three endpoints did not follow a dose-dependent pattern regarding BaA exposure, and effects were observed from the lowest concentration tested.

Regarding the toxicity threshold of BaA, identical LOEC values were obtained for developmental defects, DNA damage, and the locomotion assay e.g. $0.92 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$. This BaA concentration level is currently detected worldwide in contaminated sediments from various aquatic ecosystems (Table 1). Although BaA is likely to be more bioavailable in spiked than in naturally-contaminated sediments (Brinkmann et al. 2013), our data suggests a possible risk for fish species developing in direct contact with BaA-contaminated sediments. It should also be kept in mind that in the environment PAHs occur in complex mixtures and therefore antagonistic, additive or synergistic effects with other compounds can also occur (Billiard et al. 2008).

The MN assay is commonly performed to assess genotoxicity in cell lines, erythrocytes, hepatocytes, or gill cells of multi-cellular organisms (Classidy et al. 2007, Liu et al. 2013, Llorente et al. 2012, Monarca et al. 2004). The main limitation of these MN tests is that they are performed on one single cell type and at an adult stage and thus present a low mitotic index. The method proposed herein integrates damage from different cell types and from young cells since they originate from the whole body at an early stage of development. This study recorded basal MN frequency in fish early developmental stages at around 4 ‰ which is considerably higher than the 0.7-1 ‰ values obtained from erythrocytes of adult medaka (Liu et al. 2013). This could be explained by a higher mitotic index of cells from early life stages compared to adults, since the frequency of MN is highly related to the kinetics of cell proliferation, species, and to the method used (Al-Sabti and Metcalfe 1995). High cell renewal could result in fixation of DNA damage and hence to an increased frequency of MN in impaired cells.

The locomotion assay with light challenge revealed a similar behavior pattern for larvae of *Oryzias latipes* and *Danio rerio*, with a striking increase in swimming activity for a few seconds after the light was switched off (Cowden et al. 2012, MacPhail et al. 2009). Disruption of the visual motor response of fish larvae has already been reported following exposure to hydrophobic compounds (Carvalho et al. 2008, Péan et al. 2013). Disruption of swimming activity was correlated to morphological abnormalities in this study, but endocrine disruption or alterations of neurotransmitter pathways have also been mentioned as other possible explanations for PAHs changing larvae locomotion (Barron 2002). For instance, dopamine regulates light adaptation in retinal ganglion cells, and serotonin modulates seasonal and day/night cycles (Dulcis and Spitzer 2008, Falcón 1999). Both of these neurotransmitters were affected in BaP-exposed rainbow trout (Gesto et al. 2009). Further studies are needed to better understand the mechanistic pathway connecting PAH exposure to locomotion disruption such as, for example, measurement of internal neurotransmitter concentrations. Several studies have shown that the locomotion assay on newly hatched larvae is integrative of diverse responses of the organism to toxic compounds such as disruption of the central nervous system and visual and morphological defects (Cowden et al. 2012, Emran et al. 2007).

Table 4. Sensitivity of the different MELAc endpoints regarding toxicity of BaA

	LOEC ¹ (µg g ⁻¹ dw)
Embryonic heartbeat	12.154
% of abnormal larvae	0.917
MN assay	0.917
Locomotion assay	0.917

¹Lowest Observed Effect Concentration

The lowest observed effect concentration (LOEC) for the different significant toxicity endpoints are compared in Table 4. The MN and locomotion assays appeared as sensitive as the classical Medaka embryo-larval assay. Combination of these three assays would allow detection of a larger spectrum of toxicants exhibiting different modes of action. In addition, it could allow a more accurate measurement of the toxicity of complex mixtures of pollutants.

This kind of assay could therefore be very useful for predictive evaluation of new chemicals (Reach regulation) and also for water and sediment quality assessment in relation to the European Water Framework Directive (EC 2000). Last but not least, these assays require a reduced number of animals at early life stages which is in accordance with the 3Rs rules for alternative animal testing (EC 2010).

Conclusion

This work is the first describing MN and locomotion assays in Japanese medaka larvae. These assays, in addition to classical developmental criteria, was shown to improve the sensitivity of detection of toxicants and should be taken into consideration for risk assessment of new chemicals. Exposure to BaA induced developmental defects, DNA damage and locomotion disruption in fish early life stages at concentrations occurring in the aquatic environment. BaA could therefore represent a risk for the recruitment of fish species developing on sediments in the vicinity of urban or industrial areas.

Acknowledgments

This work was funded by the French ANR CES within the framework of the ConPhyPoP (2009-002) research project. Florane Le Bihanic received a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence continental to coastal ecosystems. The authors wish to thank Christelle Clérandeau and Laure Landi for their help with fish maintenance, and also Guus Bongers (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) for their technical support and discussion on behavior analysis.

References

- Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343(2-3), 121-135.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.-D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D. and Donnelly, K.C., 2008. In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2), 454-464.
- Barron, M.G. 2002. *Behavioural Ecotoxicology*. Dell'Omo, G. (ed), John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X. and Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47(5), 415-439.
- Belanger, S.E., Balon, E.K. and Rawlings, J.M., 2010. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquatic Toxicology* 97(2), 88-95.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J.P., Schäffer, A., Hecker, M., Wölz, J., Schüttrumpf, H. and Hollert, H., 2013. How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in

rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquatic Toxicology* 128-129(0), 13-24.

Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., Le Menach, K. and Garrigues, P., 2000. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 367(2), 165-171.

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D. and Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79(3), 257-267.

Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H. and Winn, R., 2007. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environmental Science & Technology* 41(22), 7830-7836.

Carvalho, P.S.M., Kalil, D.d.C.B., Novelli, G.A.A., Bainy, A.C.D. and Fraga, A.P.M., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Marine Environmental Research* 66(1), 205-207.

Çavas, T., 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology* 46(1), 352-358.

Classidy, C.L., Lemon, J.A. and Boreham, D.R., 2007. Impacts of low dose gamma-radiation on genotoxic risk in aquatic ecosystems. *Dose-response* 6, 323-332.

Couillard, C.M., Légaré, B., Bernier, A. and Dionne, Z., 2011. Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. *Marine Environmental Research* 71(4), 257-265.

Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K. and Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology* 33(2), 165-173.

Dulcis, D. and Spitzer, N., 2008. Illumination controls differentiation of dopamine neurons regulating behaviour. *Nature* 456(13), 195-202.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T. and Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97(2), 79-87.

Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., Wong, K.Y., Kraves, S. and Dowling, J.E., 2007. OFF ganglion cells cannot drive the optokinetic reflex in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(48), 19126-19131.

Emran, F., Rihel, J. and Dowling, J.E., 2008. A Behavioral Assay to Measure Responsiveness of Zebrafish to Changes in Light Intensities. *Journal of Visualized Experiments* (20), e923.

Falcón, J., 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology* 58(2), 121-162.

Gao, Y., de Brauwere, A., Elskens, M., Croes, K., Baeyens, W. and Leermakers, M., in press. Evolution of trace metal and organic pollutant concentrations in the Scheldt River Basin and the Belgian Coastal Zone over the last three decades. *Journal of Marine Systems*.

Gaspere, L., Machiwa, J.F., Mdachi, S.J.M., Streck, G. and Brack, W., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the intertidal areas of Dar es Salaam, Tanzania. *Environmental Pollution* 157(1), 24-34.

Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L. and Míguez, J.M., 2009. β -Naphthoflavone and benzo[a]pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1), 191-198.

Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M. and Correia, A.D., 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108(2), 205-213.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T. and Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399(2), 125-133.

Helmstetter, M.F. and Alden, R.W., 1995. Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Aquatic Toxicology* 32(1), 1-13.

Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K. and Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217(3), 308-321.

Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121(7-8), 605-618.

Kido, T., Sakakibara, H., Ohura, T., Guruge, K.S., Kojima, M., Hasegawa, J., Iwamura, T., Yamanaka, N., Masuda, S., Sakaguchi, M., Amagai, T. and Shimoi, K., 2013. Evaluation of chlorinated benz[a]anthracene on hepatic toxicity in rats and mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Toxicology* 28(1), 21-30.

Le Bihanic, F., Perrichon, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X. and Cachot, J., submitted. Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*.

Liu, N., Ma, M., Xu, Y., Zha, J., Rao, K. and Wang, Z., 2013. Susceptibility of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to 2,4,6-trichlorophenol-induced micronuclei in peripheral erythrocytes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 7(1), 77-84.

Llorente, M.T., Parra, J.M., Sánchez-Fortún, S. and Castaño, A., 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of sewage treatment plant effluents in rainbow trout cells (RTG-2). *Water Research* 46(19), 6351-6358.

MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D. and Padilla, S., 2009. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* 30(1), 52-58.

Mersch-Sundermann, V., Mochayedi, S. and Kevekordes, S., 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in escherichia coli PQ37. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 278(1), 1-9.

Monarca, S., Zani, C., Richardson, S.D., Thruston Jr, A.D., Moretti, M., Feretti, D. and Villarini, M., 2004. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research* 38(17), 3809-3819.

Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J. and Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399(6), 2235-2242.

Norcross, B.L., Hose, J.E., Frandsen, M. and Brown, E.D., 1996. Distribution, abundance, morphological condition, and cytogenetic abnormalities of larval herring in Prince William Sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(10), 2376-2387.

OECD 1992. Guidelines for the testing of chemicals fish early life stage toxicity test, Test No. 210. Section 2: Effects on biotic systems, pp. 1-18, Organization for Economic Cooperation and Development.

Oliveira, M., Gravato, C. and Guilhermino, L., 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19(0), 206-214.

Péan, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Bégout, M.-L. and Cousin, X., 2013. Long-term food-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicology and Teratology* in press.

Polard, T., Jean, S., Merlina, G., Laplanche, C., Pinelli, E. and Gauthier, L., 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(1), 144-149.

Rocha, P.S., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T. and Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(7), 1842-1848.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F. and Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56(3), 442-448.

Warshawsky, D., Livingston, G.K., Fonouni-Fard, M. and LaDow, K., 1995. Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 26(2), 109-118.

CHAPITRE III

Etude comparée de trois mélanges de HAP de types pyrolytique, pétrogénique léger et pétrogénique lourd

Les contaminants hydrophobes, et notamment les HAP, sont retrouvés en mélanges dans l'environnement. Leur composition et leur toxicité varient en fonction de leur origine : pyrolytique, diagénétique ou pétrogénique (Barbee et al. 2008, Wang et al. 2003). Dans cette étude, la toxicité de trois mélanges de HAP de natures différentes est comparée sur les SPD de truite arc-en-ciel puis de médaka japonais. Les mélanges de HAP étudiés sont issus d'un extrait pyrolytique de sédiment de l'estuaire de la Seine, ainsi que de deux extraits de pétrole lourd *Erika* et de pétrole léger *Arabian Light*.

1 Présentation des trois mélanges de HAP

Les trois mélanges de HAP étudiés ne représentent qu'une fraction de l'échantillon de cocktail de contaminant initial. Les compositions des échantillons dont sont issues les 3 fractions aromatiques sont détaillées ci-après.

1.1 Le sédiment de l'estuaire de la Seine

L'estuaire de la Seine (**Figure 32**) est soumis à une très forte pression anthropique d'origine principalement urbaine et industrielle. De très fortes concentrations en HAP ont été relevées dans les sédiments de la partie amont de l'estuaire. Le site d'Oissel a été sélectionné comme site de prélèvement de sédiment pour sa forte contamination en HAP (Cachot et al. 2006).

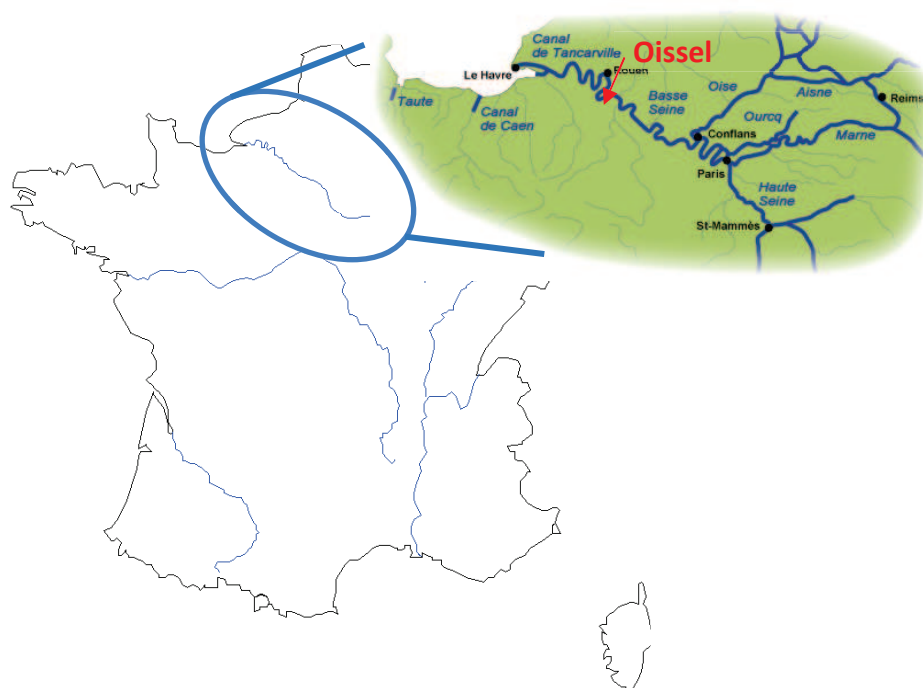


Figure 32. Estuaire de la Seine : Site de prélèvement Oissel. (Fluvialnet 2013 modifié)

On retrouve en majorité dans ces sédiments des polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds, et HAP (**Tableau 21**).

Tableau 21. Composition chimique du sédiment d’Oissel, juin 2003 (Cachot et al. 2006).

	Concentration en ng g ⁻¹ p.s.
PCB	79
Métaux lourds (Cr, Co, Ni, As, Cd, Hg)	103 100
HAP	12 492

Les PCB sont des composés massivement utilisés dans les années 1930-1970 comme isolants électriques. Depuis les années 80 leur utilisation est interdite en Europe mais on les retrouve accumulés en grande quantité dans les sédiments de l’estuaire de la Seine.

La contamination métallique de l’estuaire de la Seine est majoritairement causée par le bassin versant et des rejets locaux industriels et urbains. Les principaux métaux cancérigènes accumulés dans les sédiments au site d’Oissel sont le chrome, le cobalt, le nickel, l’arsenic, le cadmium, et le mercure.

Bien que très variée, la contamination de l’estuaire de la Seine est marquée par la prédominance des HAP essentiellement d’origine pyrolytique séquestrés dans le compartiment sédimentaire (Cachot et al. 2006). Majoritairement d’origine anthropique, les HAP proviennent des systèmes de chauffage, des gaz d’échappement automobile, de la production d’énergie, de l’industrie ou encore de l’incinération des déchets. Les HAP les plus représentés dans le sédiment prélevé au site d’Oissel sont le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[*a*]pyrène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*k*]fluoranthène.

La fraction aromatique du sédiment d’Oissel collecté au cours de l’année 2010 a été extraite afin de comparer sa toxicité à celle de deux autres mélanges de HAP d’origine pétrogénique vis-à-vis des SPD de poissons modèles.

1.2 Les pétroles *Arabian Light* et *Erika*

Les pétroles bruts sont composés en majorité de molécules contenant des atomes de carbone et d’hydrogène, i.e. des hydrocarbures, et de quelques composés mineurs tels que des composés azotés, soufrés, oxygénés et les métaux lourds qui représentent en moyenne moins de 5 % de la totalité des composés. Pour les pétroles, trois groupes d’hydrocarbures se distinguent : les hydrocarbures aliphatiques saturés, les résines et asphaltènes, et les hydrocarbures aromatiques. Cette étude porte sur deux pétroles : un pétrole brut *Arabian Light* et un pétrole raffiné *Erika* (**Tableau 22**).

Tableau 22. Composition chimique du pétrole *Arabian Light* et *Erika*

	<i>Arabian Light</i> ¹	<i>Erika</i> ²
Hydrocarbures aromatiques	15 %	22 %
Hydrocarbures saturés	75 %	42 %
Résines et asphaltènes	10 %	35 %

¹D’après Wang et al. (2003) ; ²D’après Baars et al. (2002)

Les hydrocarbures saturés incluent 3 groupes d'hydrocarbures qui diffèrent par leurs structures : les alcanes, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes. Ces composés sont très peu hydrosolubles et représentent la majorité des constituants des pétroles légers comme l'*Arabian Light*.

Les résines et asphaltènes sont des composés polaires, plus hydrosolubles, constituant la fraction lourde des pétroles. Ils sont plus abondants dans les pétroles lourds comme l'*Erika*.

Les hydrocarbures aromatiques représentent un mélange complexe de nombreux composés pouvant présenter de 1 à 6 noyaux aromatiques. Ils constituent en moyenne moins de 30 % des pétroles.

Tout comme le sédiment de l'estuaire de la Seine, la fraction HAP des pétroles *Erika* et *Arabian Light* a été extraite afin d'en évaluer la toxicité vis-à-vis des SPD de poissons.

1.3 Les profils des trois extraits aromatiques

La composition des trois mélanges de HAP étudiés varie en termes de proportion en composés méthylés et de nombre de cycles des molécules. Les rendements d'enrobage des extraits ainsi que les résultats ci-après ont été calculés en prenant en compte uniquement les 21 HAP parents, les composés mono-méthylnaphtaléniques et mono-méthylphénanthréniques.

Tableau 23. Profils chimiques des extraits pyrolytique, issu de pétrole *Arabian Light* et de pétrole *Erika* (ng/g⁻¹).

Composés	N cycles	Extrait pyrolytique	Extrait pétrole <i>Arabian Light</i>	Extrait pétrole <i>Erika</i>
Naphtalène*	2	7821	133174	88512
Acénaphthylène*	3	4760	15790	441
Acénaphène*	3	2816	16013	34947
Fluorène*	3	4664	38399	59845
Dibenzo[<i>b,d</i>]thiophène	3	3669	218057	101474
Phénanthrène*	3	26382	60527	280729
Anthracène*	3	14488	1127	38753
Fluoranthène*	4	55698	350	23175
Pyrène*	4	49543	4550	137619
Benzo[<i>a</i>]anthracène*	4	33623	1961	111990
Triphénylène + Chrysène*	4	39898	12010	275531
Benzo[<i>b</i>]naphto[2,1- <i>d</i>]thiophène	4	9615	21646	154404
Benzo[<i>b+k+j</i>]fluoranthène*	5	76821	1976	59917
Benzo[<i>e</i>]pyrène	5	32249	4464	92175
Benzo[<i>a</i>]pyrène*	5	32987	640	56546
Pérylène	5	13320	1149	29962
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène*	6	32042	<ld ¹	5291
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène* +Dibenzo[<i>ac</i>]anthracène	5	9327	<ld	17120
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène*	6	29453	1194	93063
2-Méthylnaphtalène	2	4933	247071	311912
1-Méthylnaphtalène	2	2703	281590	187400
3-Méthylphénanthrène	3	4806	52463	227262
2-Méthylphénanthrène	3	7479	55060	291532
2-Méthylanthracène	3	2723	41020	83615
9-Méthylphénanthrène+2-Méthylanthracène	3	5678	100535	190747
1-Méthylphénanthrène	3	3622	67581	182057

¹limite de détection

* HAP considéré polluant prioritaire par l'US EPA

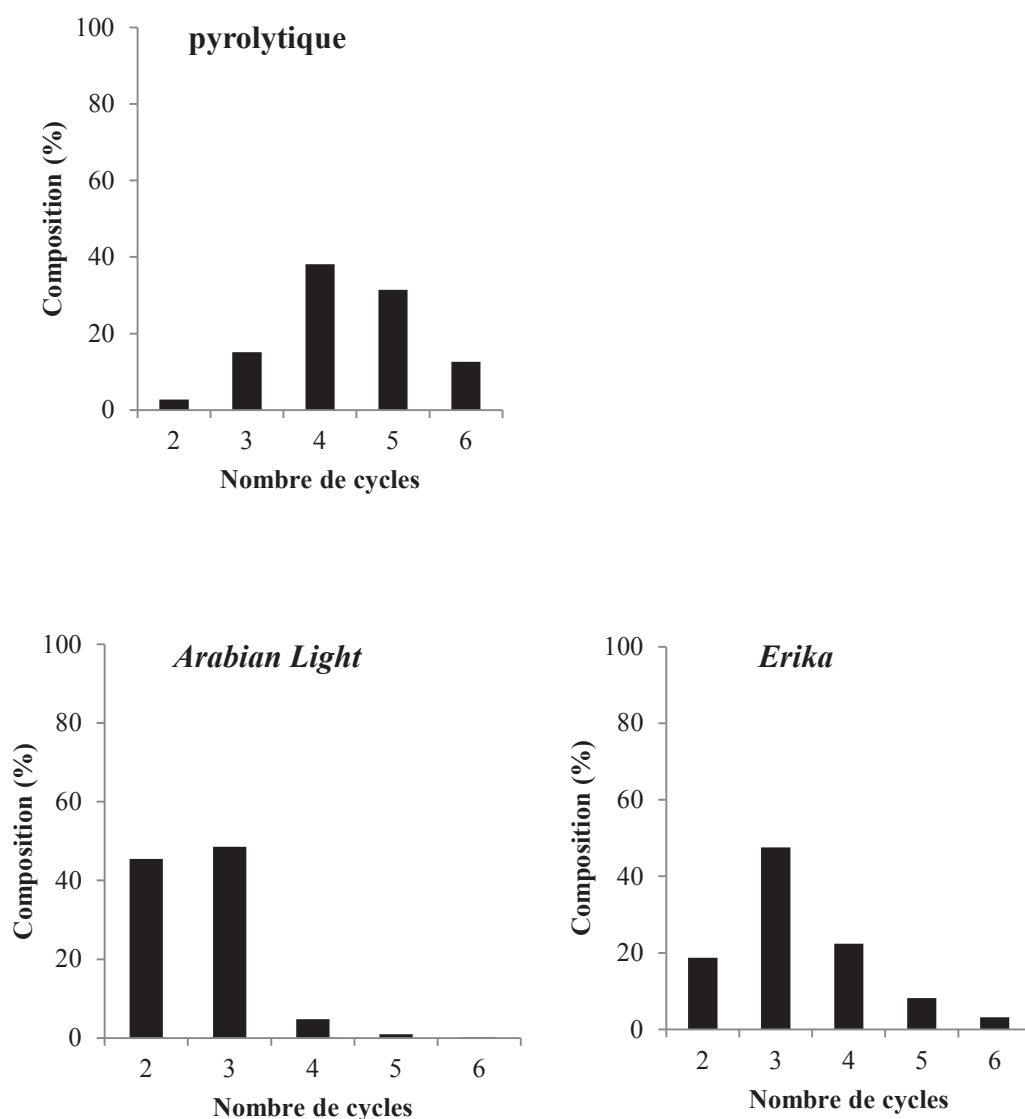


Figure 33. Nombre de cycles constituant les trois extraits.

L'extrait aromatique du pétrole *Arabian Light* est composé à 45 % de HAP légers à deux cycles aromatiques (HAP parents et méthylés confondus), 49 % de HAP à trois cycles aromatiques et présente moins de 1 % de composés à cinq et six cycles. L'extrait aromatique du pétrole *Erika* est composé en majorité de 47 % de HAP à trois cycles aromatiques tandis que l'extrait pyrolytique est composé de molécules plus lourdes présentant quatre cycles aromatiques pour la plupart.

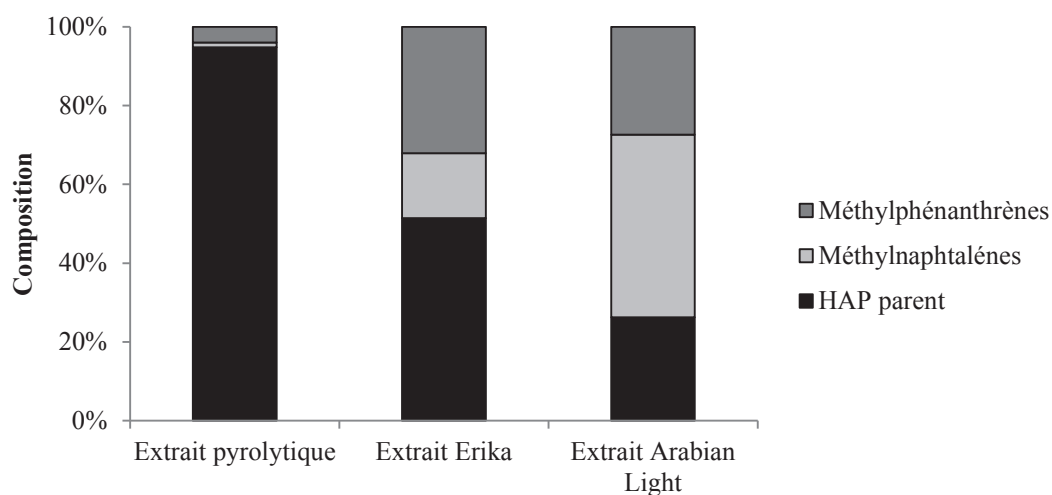


Figure 34. Profil de méthylation des trois extraits HAP Pyrolytique, de l'*Erika*, et l'*Arabian Light*.

L'extrait pyrolytique est composé en majorité de HAP parents représentant 94 % des HAP totaux. L'extrait issu du pétrole *Erika* est composé en proportion équivalente de HAP parents et de composé méthylés dont 16 % de méthylnaphtaléniques et 31 % de méthylphénanthréniques. L'extrait issu du pétrole *Arabian Light* est composé en majorité de HAP méthylés dont 38 % de méthylnaphtaléniques et 23 % de méthylphénanthréniques. L'extrait de pétrole *Erika* est la fraction qui présente la proportion la plus importante de composés méthylés en particulier de méthylphénanthréniques.

2 Article n° 4: Toxicité des trois mélanges de HAP sur les jeunes stades de truite arc-en-ciel

Dans l'article n° 4, un nouveau test embryo-larvaire a été développé afin de comparer la toxicité de mélanges de HAP de diverses compositions vis à vis des SPD de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Puisque les HAP sont des composés faiblement solubles dans l'eau, le bioessai a été basé sur une exposition des embryons à des graviers enrobés afin de se rapprocher des conditions environnementales. L'exposition est statique et consiste à incuber les embryons directement sur les graviers artificiellement enrichis en fraction aromatique, du stade œillé jusqu'aux éclosions dans l'obscurité à 10 °C.

Tout d'abord le design expérimental a été testé en utilisant deux HAP modèles, le fluoranthène (Fluo) et le benzo[a]pyrène (BaP). Aucun effet n'a été observé sur les embryons témoins incubés dans de l'eau seulement ou sur des graviers enrobés au solvant. Les deux composés ont révélé leur caractère tératogène vis à vis de la truite arc-en-ciel. Considérant ces résultats, le design expérimental testé s'est avéré adapté pour tester sensiblement la toxicité de contaminants avec les SPD de truite arc-en-ciel. Bien que le Fluo présente un coefficient de partage sol-eau plus faible ($\log K_{oc} = 4,6-4,7$) que le BaP ($\log K_{oc} = 5,7-6,7$), les molécules de Fluo ont été davantage adsorbées sur les graviers que les molécules de BaP. Une taille plus importante des molécules de BaP pourrait en être l'explication.

Puis, une fois le design expérimental validé, la méthode a été appliquée à la comparaison de la toxicité de trois fractions aromatiques vis à vis des SPD de truite arc-en-ciel caractérisées par différentes proportions en HAP. La première fraction aromatique était d'origine pyrolytique et extraite à partir d'un sédiment contaminé de l'estuaire de la Seine (Oissel, France). Les deux autres fractions d'origine pétrogénique étaient issues d'un pétrole léger *Arabian Light*, et d'un autre pétrole plus lourd *Erika*. Plusieurs paramètres ont été enregistrés dont la survie, le retard d'éclosion, le succès d'éclosion, la biométrie, les malformations et les dommages à l'ADN (tests des comètes et micronoyaux sur cellules sanguines). La toxicité de ces trois fractions aromatiques a été testée à deux concentrations environnementales différentes 3 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. pour la somme des HAP (concentrations nominales). Les fractions aromatiques *Arabian Light* et pyrolytique ont induit majoritairement des effets sous-létaux sur la truite arc-en-ciel dont la réduction des tailles de larves et des hémorragies. Des effets létaux ont été observés pour 4,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. de pétrole *Erika* (concentration mesurée) dont l'accroissement de la mortalité embryonnaire et une diminution du taux d'éclosion. Le potentiel génotoxique des fractions aromatiques *Arabian Light* et *Erika* a été révélé par le test des comètes. En revanche, le test MN mettant en évidence les dommages à l'ADN irréversible, n'a pas détecté d'effet significatif. Les tests génotoxiques ont été réalisés quelques jours après les éclosions, il est alors possible que les dommages à l'ADN ne soient pas encore définitivement fixés dans les érythrocytes des larves.

Le degré et le spectre de toxicité ont différés suivant les extraits testés. La toxicité des fractions aromatiques n'a pas augmenté linéairement avec l'augmentation de la proportion en HAP de haut poids moléculaire. Un gradient de toxicité est apparu: pyrolytique < *Arabian Light* < *Erika*. La fraction pyrolytique avec la plus forte proportion de composés à haut poids moléculaire s'est révélée la moins toxique vis à vis des SPD de truite, puis la fraction *Arabian Light* modérément toxique. La fraction *Erika* comprenant une forte proportion d'HAP tricycliques alkylés a induit le maximum d'effet. Les concentrations et proportions en composés tricycliques, i.e. phénanthrènes et anthracènes alkylés, semblent contrôler la génotoxicité et tératogénicité des fractions aromatiques vis à vis des SPD de truite.

Les conditions d'exposition des embryons étaient réalistes à la fois par rapport aux conditions naturelles d'habitat des embryons de salmonidés, et par rapport aux concentrations environnementales en HAP. La plus faible concentration causant des défauts de développement était de $0,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. de HAP (concentration mesurée), indiquant une forte sensibilité du bioessai et validant son utilité pour l'évaluation de la toxicité de polluants adsorbés sur les particules.

Référence

Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Budzinski H, Menach K, Cachot J (2014): Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. Environ Sci Pollut Res, 1-12

ARTICLE IV

Référence

Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Budzinski H, Menach K, Cachot J (2014): Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. Environ Sci Pollut Res, 1-12

or more recently the *Deepwater Horizon* oil spill. Because of their hydrophobicity, PAHs accumulate in sediments over time, which in turn become a continuous source of exposure for benthic organisms.

Fish embryos and eleutheroembryos (yolk fry) are sensitive to a large range of chemicals (Embry et al. 2010; Belanger et al. 2010). Moreover, they are also suitable models for chemical testing since they are not covered by the EU regulations on animal experimentation (EC 2010). Among others, salmonids are widely used model species in ecotoxicology (Hawkins et al. 2002; Cook et al. 2003; Carls and Thedinga 2010). They are also suitable species for mesocosm and field studies (Escarti and Porte 1999; Brinkmann et al. 2013). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) presents several further advantages as being commercially available, easy to breed, having low basal embryo mortality in laboratory settings (below 10 %), a fully documented development and a high sensitivity to pollutants - in particular PAHs - at early life stages (Brinkworth et al. 2003; Hodson et al. 2007).

PAHs occur in complex mixtures in the environment, their composition and toxicity vary markedly depending on their sources: pyrolytic, diagenetic or petrogenic (Wang et al. 2003; Barbee et al. 2008). The additive toxicity of PAH compounds in complex mixtures is a controversial subject. Recent studies disprove the aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist approach to estimate PAH mixture toxicity (Incardona et al. 2005; Billiard et al. 2008). In this study, an embryo-larval assay was developed to compare the toxicity of PAH mixtures of different compositions to *Oncorhynchus mykiss* early life stages (ELS). Taking into consideration the natural spawning conditions of salmonids and the poor solubility of PAH in water, the assay was based on direct exposure to PAH-spiked gravel at realistic environmental concentrations. Although aquatic organisms seem to be more sensitive to dissolved PAH (Geffard et al. 2003; Carls and Meador 2009), other studies underlined the evident contribution of the sediment for fish embryo contamination (Kocan et al. 1996). Compared to classical embryo-larval assays using waterborne exposure, this assay mimics the double exposure of fish embryos via the aqueous phase, the pore water and direct contact with contaminated sediment particles.

The experimental design was firstly tested using two model PAHs, fluoranthene and benzo[a]pyrene. Those two compounds were selected for their high capacity to adsorb onto particles and their ubiquity in aquatic environment (Guasch et al. 2012). The validated experimental design was then applied for toxicity comparison of three different PAH fractions to rainbow trout ELS: (1) a pyrolytic PAH fraction (PY) from a contaminated sediment of the Seine river, (2) an *Arabian Light* oil PAH fraction (LO), and (3) an *Erika* oil PAH fraction (HO). Several endpoints were recorded including survival, hatching delay, hatching success, biometry, developmental defects, and DNA damage measured by the comet and the micronucleus assays.

Materials and methods

PAH fraction samples

The pyrolytic PAH fraction (PY) was obtained from a superficial sediment (oxic layer) of the Seine river, sampled in March 2010 in Oissel (Normandy, France). Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE) provided both the *Arabian Light* oil (LO) and the *Erika* heavy oil (HO). PY fraction was extracted using pressurized liquid extraction with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). The two oils were dissolved in pentane to induce asphaltene precipitation. The sediment extract and the two pentane extracts were then reconcentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas City, USA). All three PAH samples were then purified using alumina columns (preparative liquid chromatography) and eluted with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). After another reconcentration step, aliphatic fractions obtained after elution on silica columns with pentane were discarded, and aromatic fractions were obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents. Atlantic Labo (Bruges, France) provided the pentane solvent. Finally, samples were reconcentrated, and the final fractions were kept in dichloromethane (stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) for spiking experiments. All the steps were gravimetrically controlled in order to prevent PAH losses and also to be able to express results in terms of quantity of the initial material (i.e., sediment or petroleum).

Gravel spiking

Silica gravel of 2–4 mm size was provided by Sibelco sandpit (gravel reference BB 2/4, Mios, France). It was washed in HCl (1 %, v/v) and rinsed with reverse osmosis water before use. The clean gravel (50 g dw) was then spiked with 100 mL of dichloromethane (Biosolve, Valkenswaard, the Netherlands) used as a spiking solvent or individual PAHs alone or in mixture in a 1-L glass flask using a rotary evaporator (Rotavapor, IKA, Staufen, Germany). For validation of the experimental design, the gravel was spiked with $3,000\text{ ng g}^{-1}$ dw of benzo[a]pyrene (BaP) or fluoranthene (Fluo) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). For PAH fraction testing, the gravel was spiked with $0.3\times$ and $1\times$ concentrations of each PAH fraction. $1\times$ concentration refers to the total PAH content in sediment from the upper Seine estuary, e.g., $10,000\text{ ng g}^{-1}$ dw (Cachot et al. 2006). Solvent was evaporated at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 115 rpm for 2 h. An aliquot of the spiked gravel was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in anticipation of chemical analysis. Remaining spiked gravel (40 g dw) was kept in the dark and at room temperature prior to the assay.

Chemical analysis

Internal deuterated standards naphthalene d8 (EGA-CHEMIE), dibenzo[*b,d*]thiophene d8 (MSD isotopes), phenanthrene d10 (Cambridge Isotope Laboratories), anthracene d10 (Cambridge Isotope Laboratories), fluoranthene d10 (MSD isotopes), chrysene d12 (MSD isotopes), benzo[*e*]pyrene d12 (Cluzeau-CDN Isotopes), benzo[*a*]pyrene d12 (Cambridge Isotope Laboratories), and benzo[*ghi*]perylene d12 (Cambridge Isotope Laboratories) were added prior to extraction to 1 g of gravel and one blank analysis composed of extraction solvent only. PAH compounds were extracted for 10 min at 30 W using microwave-assisted extraction, with dichloromethane as solvent (Budzinski et al. 2000). Samples were then reconcentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas City, USA). Reconcentrated extract samples were purified using alumina microcolumns and eluted with 3 × 5 mL of dichloromethane. After a new reconcentration with gas nitrogen, the aliphatic fraction was eluted on silica microcolumns using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents. Finally, samples were reconcentrated in isooctane (Scharlau, Barcelona, Spain). Pyrene d10 and benzo[*b*]fluoranthene d12, both supplied by Cambridge Isotope Laboratories, were added to the samples as syringe standards before injection. PAHs were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as described by Baumard et al. (1998) and included 21 parent compounds: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, dibenzo[*bd*]thiophene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene, triphenylene, chrysene, benzo[*b*]naphtho[2,1-*d*]thiophene, benzo[*b+k+j*]fluoranthene, benzo[*e*]pyrene, benzo[*a*]pyrene, perylene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, dibenzo[*ah*]anthracene, dibenzo[*ac*]anthracene, and benzo[*ghi*]perylene; as well as methyl compounds: 2-methylnaphthalene, 1-methylnaphthalene, 3-methylphenanthrene, 2-methylphenanthrene, 2-methylanthracene, 9-methylphenanthrene+2-methylanthracene, 1-methylphenanthrene, 4-methyldibenzothiophene, 3+2-methyldibenzothiophenes, 1-methyldibenzothiophene, dimethylnaphthalenes, trimethylnaphthalenes, tetramethylnaphthalenes, dimethylphenanthrenes, trimethylphenanthrenes, and methylchrysenes. Extraction recoveries calculated with internal and syringe standards were overall very satisfactory, equivalent on average to 87 %. Limits of quantification were evaluated for each PAH compound using the peak to peak method of calculation.

Experimental setup validation

To ensure a suitable time period for exposure and stabilized dissolved oxygen concentration, several experimental designs

were tested including dynamic water renewal, static daily water renewal, and static water (water not renewed). Since there was no marked difference in trout development according to the experimental design (unpublished data), exposure was set from the eyed stage until the hatching stage in static water conditions in order to limit wash out of spiked gravel. To validate this experimental design, a preliminary experiment was performed exposing embryos to two model PAHs, BaP and Fluo.

Embryo exposure

INRA-PEIMA (Sizun, France) provided rainbow trout embryos at eyed stage, e.g., 180 degree day (DD: number of days × temperature). Each treatment was replicated three times. For each single replicate, 25 embryos were laid in a 100-mL glass jar containing 12 g dw of spiked gravel and 50 mL of Saint Martin spring water, dechlorinated with 48-h aeration (St Martin de Gurçon, France, pH 8.2; 68 mg L⁻¹ Ca²⁺; 21 mg L⁻¹ Na²⁺; 11 mg L⁻¹ Mg²⁺; 2 mg L⁻¹ K⁺; 216 mg L⁻¹ HCO₃²⁻; 39 mg L⁻¹ SO₄²⁻; 28 mg L⁻¹ Cl⁻; <1 mg L⁻¹ NO₃⁻). To check if solvent or gravel induced effects on embryo development, a water-only control was added. There was no water renewal during the whole exposure, and dissolved oxygen was measured daily with a fiberoptic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany) compensated with a temperature sensor PT 1000. The oxygen probe was placed at the interface between the water and the gravel. Experiments were carried out in the dark at 10 °C in a climate chamber (Snijders Scientific, Tilburg, the Netherlands). At 280 DD, corresponding to 10 days after the start of the experiment, exposure of the embryos was stopped. Embryos were transferred into new glass jars containing 50 mL of spring water without sediment, with 20 mL of water renewed daily. Once hatched, larvae were kept in separated glass jars containing 50 mL of spring water. At 400 DD, corresponding to the end of the 22 days of the experiment, all remaining individuals were euthanized with a lethal dose of 120 mg L⁻¹ ethyl 4-aminobenzoate (benzocaine, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

Phenotypic effects

Embryonic and larval survivals were recorded daily. Dead individuals were immediately removed to avoid water alteration. Individuals were considered half-hatched if at least a part of the embryonic body remained inside the chorion. Embryonic, larval, or half-hatched mortality refers to the number of dead individuals at the end of the experiment compared to the total number of individuals at the beginning (180 DD). Hatching time refers to the number of DD from fertilization to hatching.

Occurrence of developmental abnormalities was microscopically examined on 15 larvae per replicate between 0

and 24 h posthatching. The larvae under examination were laid on a Petri dish containing 1.5 % agarose gel (LB Agar) and 2 mL of spring water. Larvae were photographed at $\times 20$ magnification using a stereomicroscope MZ 7.5 Leica coupled with a CCD camera DFP420C Leica (Nanterre, France) and a cold light source (Intralux® 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland). Total body length and head length of larvae were measured using Leica Microsystems software v3.8 (Nanterre, France). Six types of abnormality were recorded in larvae: edemas (yolk sac, pericardia, or skeletal); spinal (scoliosis, lordosis, or kyphosis) and craniofacial (skull and jaw shape deformities) deformities; cardiac anomalies (changes in heart location and ventricle size); hemorrhages (located on the skeleton, yolk sac, skull, or jaw); and yolk sac resorption defects. Abnormal larvae rate referred to the percentage of abnormal larvae presenting at least one type of abnormality. Edema, spinal, craniofacial, cardiac hemorrhage, and yolk sac abnormality rates referred to the percentage of larvae presenting one or several abnormalities, counted once. One larva could exhibit several types of abnormalities.

Genotoxic effects

Genotoxicity assays were performed on 350 DD larvae. Peripheral blood from five individuals per replicate treatment was sampled with heparinized tips via cardiac puncture and mixed immediately with 1 mL of Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Cell viability was assessed with trypan blue exclusion as above 90 % in all samples and cell concentration at around 500 cells μL^{-1} . Cells used for comet and micronucleus assays were from the same cell suspension sample.

For the comet assay, the protocol of Singh et al. (1988) was followed. A 50- μL cell suspension was added to 100 μL of 1 % (w/w) low melting point agarose (LMPA), and two 50- μL gels were laid on slides previously covered with normal melting point agarose (1 %, w/w). Gels were shielded with an 18 \times 18 mm glass slip and hardened for 5 min at 4 °C. Coverslips were gently slid off, and a second LMPA only gel was laid on each of the first gel shields with a new coverslip. After hardening for 5 min again at 4 °C, coverslips were slid off, and slides were placed in a freshly prepared lysis solution at 4 °C for 1 h (2.5 M NaCl; 0.1 M EDTA; 0.01 M Tris; pH adjusted to 10 with NaOH). One percent of Triton X-100 was added to the solution extemporaneously. Slides were then placed on a horizontal electrophoresis tray and covered with freshly prepared electrophoresis buffer (0.3 M NaOH; 1 mM EDTA; pH > 13) for 10 min to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was carried out at 25 V, 300 mA for 10 min. Subsequently, slides were rinsed three times in a staining tray with neutralization solution (0.4 M Tris; pH = 7.5) for 5 min at 4 °C. Finally, slides were dehydrated in absolute ice-cold ethanol for a further 20 min and dried at room temperature. Before reading, slides were stained with 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide. Comet analysis was performed at $\times 400$ magnification using an Olympus epifluorescence microscope (Olympus, Rungis, France) with an excitation filter of 515–560 nm, a barrier filter of 590 nm, and a grayscale CCD camera (Zeiss, Germany). DNA damage was measured on 100 cells for each sample with Komet 5.5 software (Kinetic Imaging, Liverpool, UK) and expressed as percentage tail DNA. Heavily damaged cells were counted as “hedgehogs,” referring to apoptotic or necrotic cells (Olive and Banáth 1995).

For the micronucleus (MN) assay, samples were centrifuged (at 1000 rpm, for 10 min at room temperature), and pelleted cells

Table 1 Experimental setup validation. Rainbow trout embryos were exposed to FLUO- or BaP-spiked gravel

	0 (Solvent)	BaP 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw	FLUO 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw
PAH concentration (ng g^{-1} dw) (spiking efficiency %)	<LQ ^a	1,110 (37)	2,657 (88)
Embryonic mortality (%)	2.0 \pm 2.8	2.7 \pm 2.3	6.7 \pm 2.3
Larval mortality (%)	2.2 \pm 3.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Half-hatched embryos mortality (%)	0.0 \pm 0.0	2.7 \pm 4.6	0.0 \pm 0.0
Time to hatch (DD)	359.2 \pm 9.4	362.7 \pm 4.2	360.4 \pm 4.7
Hatching rate (%)	94.0 \pm 2.8	86.7 \pm 2.3	92.0 \pm 10.6
Larvae head length (mm)	12.6 \pm 0.6	12.4 \pm 0.3	12.2 \pm 0.1
Larvae total length (mm)	2.70 \pm 0.13	2.62 \pm 0.06	2.62 \pm 0.06
Larval abnormalities (%)	10.0 \pm 4.7 ^a	64.4\pm13.9^b	56.7\pm8.8^b
Yolk-sac	0.0 \pm 0.0	8.9 \pm 10.2	5.0 \pm 4.4
Spinal	0.0 \pm 0.0 ^a	17.8\pm3.8^b	16.7\pm3.3^b
Craniofacial	0.0 \pm 0.0	4.4 \pm 3.8	16.1 \pm 9.5
Cardiac	0.0 \pm 0.0	2.2 \pm 3.8	2.2 \pm 3.8
Edema	10.0 \pm 4.7 ^a	35.6\pm7.7^b	38.3\pm10.4^b
Hemorrhages	0.0 \pm 0.0	20.0 \pm 11.5	25.0 \pm 14.4

Bold characters and different letters refer to significant differences with solvent control (mean \pm SD, $N=3$, ANOVA, $p<0.05$)

^a <LQ

were fixed in 200 μ L of a mixed solution of acetic acid: methanol (1:4, v/v). Cell suspensions were then smeared onto slides and then dried for 24 h at room temperature. Just before reading, slides were stained with 40 μ L of acridine orange solution (0.003 % in PBS) and covered with a glass slip. Reading was processed using an epifluorescence microscope at $\times 400$ magnification (Olympus, Rungis, France). The

frequency of MN cells was manually recorded on 1,000 cells per slide using blind review analysis by a single observer. A cell was considered micronucleated if the MN was round shaped, distinct from main nucleus, its size was less than a third of the main nucleus, and with a similar green staining as the main nucleus (Hayashi et al. 1998). Non-isolated, stacked, more than binucleated, or orange-red-stained cells were not considered.

Table 2 Measured PAH concentrations in gravels spiked with three different PAH fractions LO, HO, or PY (ng g^{-1} dw)

Compound	N cycles	LQ ^b	Solvent	PY		LO		HO	
			0	0.3 \times	1 \times	0.3 \times	1 \times	0.3 \times	1 \times
Naphthalene ^a	2	1	<LQ	<LQ	9	<LQ	91	2	34
Acenaphthylene ^a	3	1	<LQ	7	27	<LQ	165	<LQ	5
Acenaphthene ^a	3	1	<LQ	2	12	<LQ	147	8	46
Fluorene ^a	3	5	<LQ	7	38	23	141	23	96
Dibenzo[<i>bd</i>]thiophene	3	5	<LQ	6	30	163	795	47	144
Phenanthrene ^a	3	10	<LQ	58	256	65	366	121	444
Anthracene ^a	3	10	<LQ	21	118	<LQ	32	19	68
Fluoranthene ^a	4	5	<LQ	140	490	<LQ	14	22	62
Pyrene ^a	4	5	<LQ	115	399	<LQ	12	67	256
Benzo[<i>a</i>]anthracene ^a	4	10	<LQ	79	234	<LQ	<LQ	45	182
Triphenylene + chrysene ^a	4	10	<LQ	101	315	20	89	101	376
Benzo[<i>b</i>]naphto[2,1- <i>d</i>]thiophene	4	10	<LQ	<LQ	65	36	168	49	244
Benzo[<i>b+k+j</i>]fluoranthene ^a	5	10	<LQ	205	626	<LQ	25	32	102
Benzo[<i>e</i>]pyrene	5	5	<LQ	76	235	9	36	44	160
Benzo[<i>a</i>]pyrene ^a	5	10	<LQ	74	244	<LQ	<LQ	32	120
Perylene	5	10	<LQ	28	89	<LQ	<LQ	13	58
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene ^a	6	10	<LQ	103	328	<LQ	<LQ	<LQ	38
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracene ^a + Dibenzo[<i>ac</i>]anthracene	5	5	<LQ	39	125	<LQ	<LQ	15	25
Benzo[<i>ghi</i>]perylene ^a	6	10	<LQ	86	281	<LQ	<LQ	48	187
2-Methylnaphthalene	2	1	<LQ	<LQ	15	29	524	29	239
1-Methylnaphthalene	2	1	<LQ	<LQ	4	37	621	19	172
3-Methylphenanthrene	3	10	<LQ	14	66	57	242	116	403
2-Methylphenanthrene	3	10	<LQ	14	108	69	308	183	643
2-Methylantracene	3	10	<LQ	23	<LQ	<LQ	<LQ	25	97
9-Methylphenanthrene + 2-Methylantracene	3	10	<LQ	<LQ	60	123	22	92	320
1-Methylphenanthrene	3	10	<LQ	11	61	65	283	89	317
4-Methyldibenzothiophene	3	2	<LQ	8	40	273	1,182	73	209
3 + 2-Methyldibenzothiophene	3	2	<LQ	<LQ	22	251	1,206	80	269
1-Methyldibenzothiophene	3	2	<LQ	<LQ	13	164	757	21	100
Dimethylnaphthalenes	2	5	<LQ	10	100	442	4,225	251	1,228
Trimethylnaphthalene	2	5	<LQ	17	76	859	6,198	464	1,533
Tetramethylnaphthalenes	2	5	<LQ	14	81	557	4,142	250	1,053
Dimethylphenanthrenes	3	10	<LQ	72	345	543	2,198	753	2,652
Trimethylphenanthrenes	3	10	<LQ	57	281	522	2,128	678	2,274
Methylchrysenes	4	10	<LQ	93	335	69	306	525	1,964
Σ US EPA priority PAHs ^a			<LQ	1,038	3,503	108	1,082	535	2,040
Spiking efficiency (%)				40	42	24	42	42	50

^a PAHs labeled as priority substances by the US Environmental Protection Agency

^b Limit of quantification

Statistical analysis

Each exposure condition was replicated three times, and each replicate was considered as an independent sample. Data is indicated as mean±standard deviation (SD). Normality of the data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p<0.01$). Variance homogeneity was evaluated using the Levene test ($p<0.05$). In cases of homogenous variance and normalized data, one-way ANOVA was performed, followed by the Tukey post hoc test ($p<0.05$). In opposite cases, data was analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test ($p<0.05$). Statistical analyses were performed with Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France). A principal component analysis (PCA) was performed with R software (<http://cran.r-project.org/>).

Results

Experimental setup validation

Oxygen saturation ranged between 85.3 and 103.9 % over embryonic exposure. Fluo spiking efficiency was 2.4-fold higher than BaP efficiency, and nominal concentrations reached 2.7 and 1.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw for Fluo and BaP, respectively (Table 1). No significant mortality was observed in any exposure condition. Mortality rate of solvent control embryos, half-hatched individuals, and larvae were very low (below 2.2 %). Only 10.0 % of control larvae presented developmental abnormalities. Exposure to BaP and Fluo induced significantly more abnormal larvae than control solvent. The majority of BaP- and Fluo-induced developmental defects were spinal curvatures and edemas. BaP and Fluo did not affect larval time to hatch or hatching rate. Given the low mortality and abnormality levels in the solvent control, combined with the significant adverse effects induced by BaP or Fluo exposure, the preliminary experimental setup appeared to be suitable for sensitive toxicity testing of PAH with rainbow trout ELS.

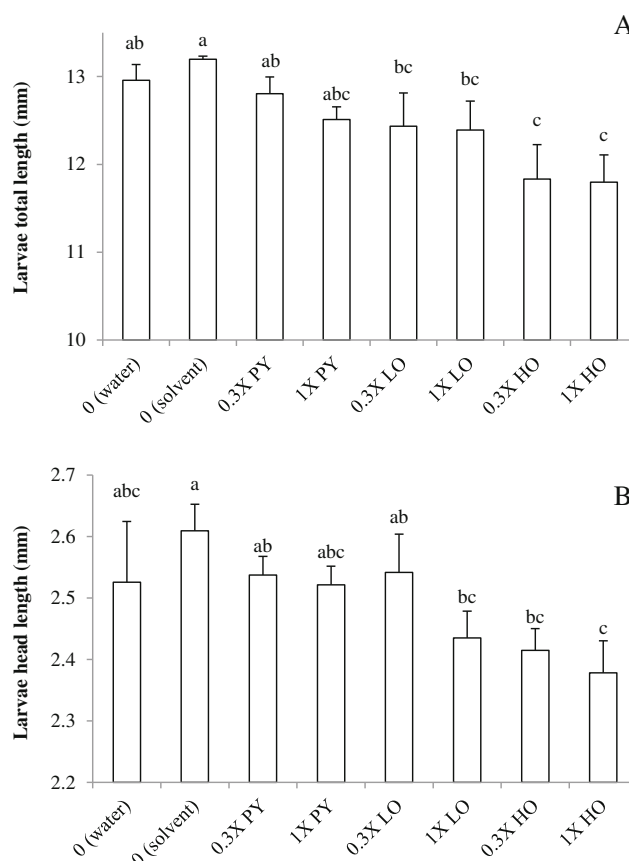


Fig. 1 Exposure to PAH fractions affected rainbow trout larvae biometry at hatching. **(a)** Larvae total length and **(b)** larvae head length. Individuals were exposed during embryonic development to chemical-spiked gravels. Different letters refer to significant differences within treatments (mean±SD, $N=3$, ANOVA, $p<0.05$)

Gravel characterization

Composition of PAH fractions differed in molecule proportions in relation to the number of cycles and the methylation level of PAHs (Table 2). The proportions of individual PAHs in spiked sediments were comparable for the 0.3× and 1× concentrations, apart from the 0.3× PY condition. Indeed, PY-spiked gravels were mainly composed of four aromatic ring compounds, representing 36 and 33 % of 0.3× and 1×

Table 3 Developmental defects in rainbow trout following embryonic exposure to the three PAH fractions PY, LO, and HO

	0 (water)	0 (solvent)	0.3× PY	1× PY	0.3× LO	1× LO	0.3× HO	1× HO
Embryonic mortality (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±2.3	1.3±2.3	1.3±2.3	0.0±0.0	13.3±8.3
Larval mortality (%)	3.9±6.8	1.7±2.9	3.5±6.1	8.7±5.5	8.0±8.9	6.3±10.8	2.6±3.7	25.1±31.2
Half-hatched embryos (%)	1.3±2.3 ^a	0.0±0.0 ^a	2.7±2.3 ^{ab}	2.7±4.6 ^{ab}	10.7±2.3^{bc}	4.0±4.0 ^a	4.0±0.0 ^{ab}	14.7±2.3^c
Hatching rate (%)	98.7±2.3 ^{ab}	100.0±0.0 ^a	97.3±2.3 ^{ab}	94.7±6.1 ^{ab}	86.7±2.3 ^{ab}	94.7±4.6 ^{ab}	96.0±2.3 ^{ab}	72.0±6.9^b
Time to hatch (DD)	315.6±5.9	318.9±6.5	316.5±3.1	311.1±5.5	310.5±12.0	316.7±6.2	308.5±8.0	308.0±6.8
Abnormal larvae (%)	26.7±6.7 ^a	31.6±9.4 ^a	48.9±7.7 ^{ab}	68.9±10.2^{bc}	81.7±10.4^{cd}	82.2±10.2^{cd}	95.6±3.8^d	100.0±0.0^d

Bold characters and different letters refer to significant differences with solvent control (mean±SD, $N=3$, ANOVA/KW, $p<0.05$)

total PAHs, respectively. LO-spiked gravel was mainly composed of two aromatic ring compounds, representing 44 and 60 % of 0.3× and 1× total PAHs, respectively. HO-spiked gravel was mainly composed of three ring compounds representing 54 and 50 % of 0.3× and 1× total PAHs, respectively. Spiking efficiencies ranged between 40 and 50 %, apart from 0.3× LO gravel which yielded 24 %.

Developmental toxicity of PAH fractions

Dissolved oxygen concentrations varied between 80 and 103 % over embryonic exposure. No significant embryonic or larval mortality was observed during exposure to PAH fractions (Table 3). No statistical difference was detected between control groups incubated in water only or to solvent-spiked gravel. Water and solvent control mortalities were below 3.9 %. Embryonic or larval mortality and time to hatch were not affected by PAH exposure. In contrast, half-hatched embryo frequency was significantly increased after exposure to 0.3× LO (10.7 %) and 1× HO (14.7 %), and 1× HO reduced significantly hatching success by 28 %. In addition, LO and HO treatments but not PY had significant effects on larvae biometry. Larvae exposed to LO and HO were 0.8 and 1.4 mm shorter than solvent-exposed larvae, respectively (Fig. 1a). LO- and HO-exposed larvae had a smaller head with

head length reduction by 6.5, 7.2, and 8.8 %, for 1× LO, 0.3×, and 1× HO treatments, respectively (Fig. 1b). Finally, all PAH fractions significantly impaired normal embryo-larval development. For 1× HO, 100 % of larvae presented at least one type of abnormality compared with 82.2 % for 1× LO and 68.9 % for 1× PY fraction (Table 3). There was no treatment effect on yolk sac resorption with on average 9.3 % of individuals exhibiting yolk sac anomalies (Fig. 2a). About 72.4 % of 1× HO larvae had a spinal curvature, 66.1 % craniofacial abnormalities, 29.3 % cardiac anomalies, and 56.6 % edema (Fig. 2b–e). Furthermore, all three PAH fractions significantly induced hemorrhages from 44.4 % for PY-exposed larvae to 91.1 % for HO-exposed larvae (Fig. 2f).

PAH fractions genotoxicity

For the comet assay, cells from the control larvae had only 3.5 % of tail DNA (Fig. 3a). 1× LO significantly increased tail DNA to 14.1 % in larvae erythrocytes and 0.3× and 1× HO to 17.0 and 27.0 %, respectively. There was no evidence of significant DNA damage induction in erythrocytes from larvae exposed to the PY fraction. Albeit the prevalence of hedgehog cells ranged from 2.6 ± 1.8 % (mean \pm SD) in controls to 17.7 ± 2.0 % for 1× HO treatment, there was no significant difference between treatments. The MN assay did

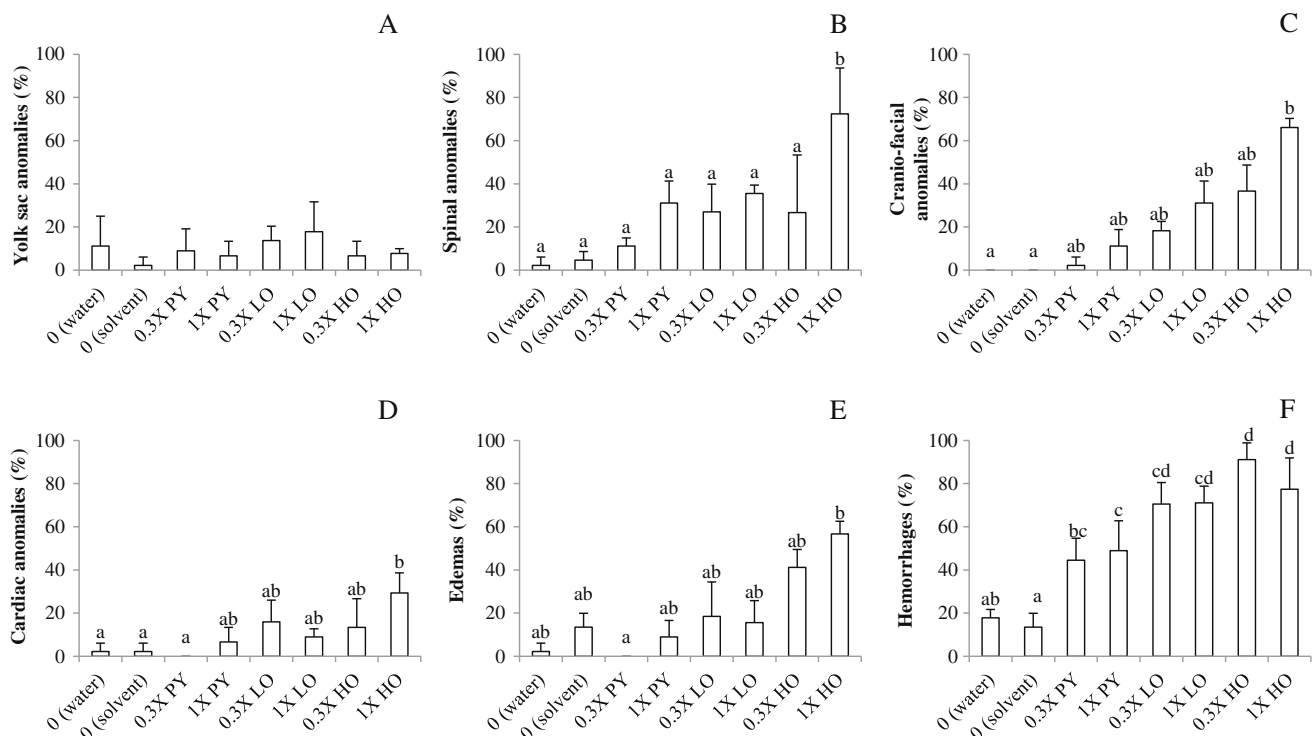


Fig. 2 Exposure to PAH fractions induced developmental abnormalities in newly hatched rainbow trout larvae. **(a)** Yolk sac resorption anomalies; **(b)** spinal abnormalities including scoliosis, lordosis, kyphosis; **(c)** craniofacial deformities including changes in skull and jaw shape; **(d)** cardiac anomalies including changes in heart location and ventricle size;

(e) edema occurrence; and **(f)** hemorrhage occurrence on skeleton, yolk sac, skull, and jaw. Individuals were exposed during embryonic development to chemical-spiked gravels. Different letters refer to significant differences between treatments (mean \pm SD, $N=3$, ANOVA, $p<0.05$)

not reveal significant increase of DNA damage with any treatment (Fig. 3b). MN erythrocytes ranged from 0.3‰ for the 0.3× PY treatment to 2.0‰ for the 0.3× LO treatment.

Principal Component Analysis of PAH fractions toxicity

The selected PCA featured 85.1 % of nine variable variances: five toxicity endpoints and four PAH gravel concentrations (Fig. 4a). Along axis 1 (70.0 %), comet assay, developmental abnormalities, and half-hatched embryos variables, with high normalized coefficients, were negatively correlated to hatching rate and total larvae length variables. Moreover, the toxicity of PAH fractions—featured by these five toxicity variables—were positively correlated (comet assay, percentage of deformities, and half-hatched embryos) or negatively correlated (hatching rate and total larvae length) to the methylphenanthrene concentration especially. In contrast, the toxicity variables were not correlated to the methyl dibenzothiophene concentration. The plot of scores for each replicate revealed no overlapping treatment group and a toxicity gradient along axis 1 as follows: solvent control < 0.3× PY < 1× PY < 0.3× LO = 0.3× HO < 1× LO < 1× HO (Fig. 4b). Low toxic fractions are located on the left negative side of axis 1, while high toxic fractions are located on the opposite side.

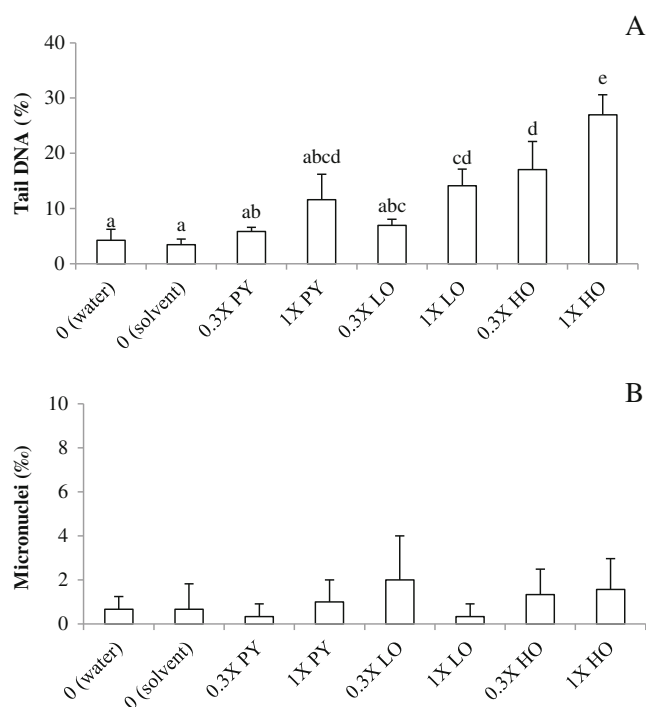


Fig. 3 Exposure to PAH fractions induced genotoxicity in rainbow trout larvae. **(a)** Comet assay. DNA damage is expressed in percentage of DNA in the comet tail. **(b)** Micronucleus assay. DNA damage is expressed in micronucleated cell frequency. Individuals were exposed during embryonic development to chemical-spiked gravels. Different letters refer to significant differences between treatments (mean±SD, $N=3$, ANOVA, $p<0.05$)

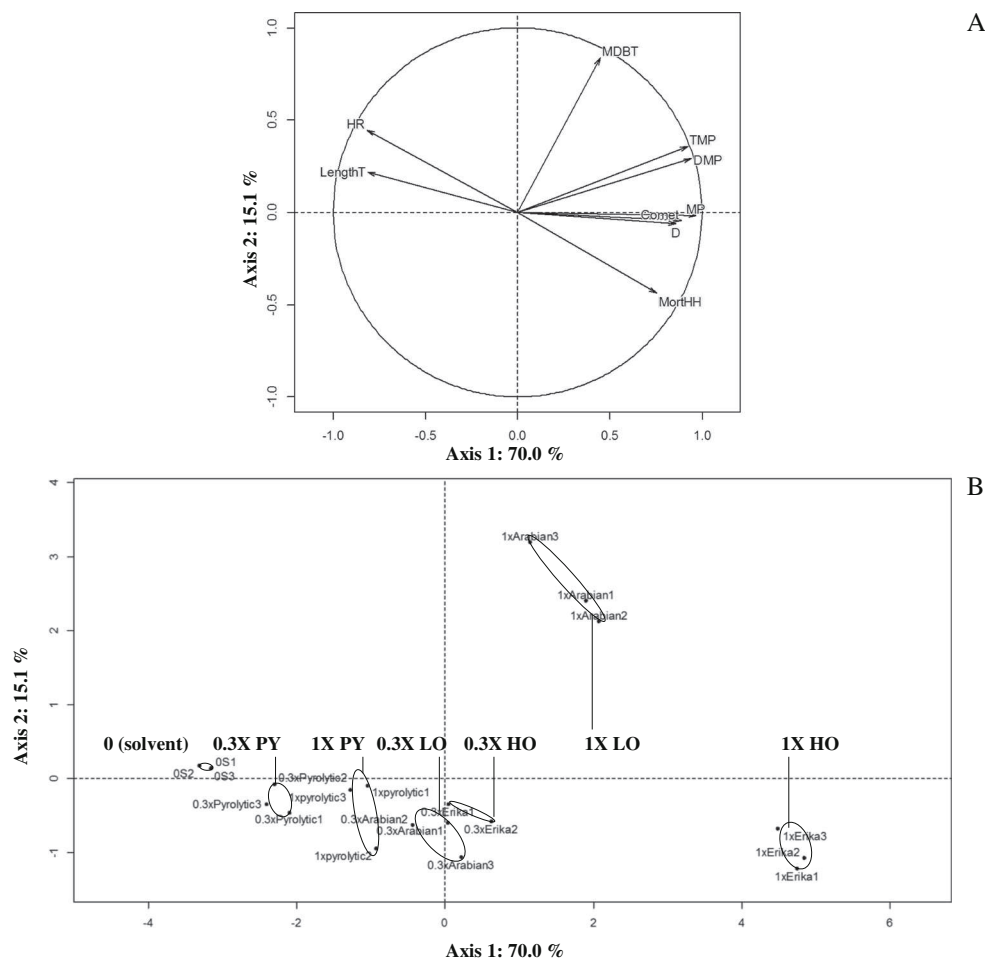
Discussion

In this paper, a new gravel-contact exposure protocol was specifically designed for toxicity assessment of hydrophobic pollutants on rainbow trout embryos. Dissolved oxygen remained high in the different assays although no water renewal was made during the experiment. Furthermore, low mortality and abnormality rates were observed in control conditions, while exposed larvae exhibited significant developmental abnormalities. Incubation of trout embryos in direct contact to non-spiked or solvent-spiked gravels did not affect embryonic development. Therefore, the experimental design with direct exposure to spiked gravels and no water renewal appeared suitable for toxicity testing of chemicals with rainbow trout ELS.

Despite a lower Log Kow, Fluo was shown to better adsorb onto gravels than BaP. Liu et al. (2011) have shown that PAHs adsorption on inorganic particles including quartz sand probably follows the Langmuir equation and is related to the hydrophobicity of the compound. Our unexpected result might be explained by the singular nature of the gravel which is exclusively composed of silica grains of relatively large size (2–4 mm). The low specific surface area of the studied gravel might favor sorption of smaller size molecules such as Fluo (4 rings, MW 202.25) instead of larger ones such as BaP (5 rings, MW 252.31).

The PAH composition of the three fractions was well-reproduced in the different spiked gravels except for the 0.3× PY-spiked gravel for which four ring compounds adsorbed much better than for the 1× PY-spiked gravel. This may be due to the loss of low molecular weight compounds during the spiking process. PAH fractions mainly induced sublethal effects in embryos and larvae including cardiovascular defects and reduced growth for PY and LO conditions. Our observations support recent studies reporting embryotoxicity in rainbow trout ELS after exposure to PAH-contaminated sediment extracts (Sundberg et al. 2005; Karlsson et al. 2008) and juvenile mullet after exposure to LO (Milinkovitch et al. 2011b). Milinkovitch et al. (2011a, b; 2013) also reported bioaccumulation of PAHs in muscle and increased levels of PAH metabolites as well as cardiac toxicity after fish exposure to LO crude oil and its water soluble fraction. Numerous studies about the toxicity of the Alaska North Slope Crude Oil (ANSKO) on pink salmon, herring, mummichog, and zebrafish reported the induction of blue sac disease syndrome, including pericardial edemas, hemorrhages, spinal deformities as well as reduced growth (Heintz et al. 1999; Couillard 2002; Barron et al. 2003; Hicken et al. 2011). The HO displayed a comparable PAH composition and featured a similar spectrum of developmental defects to the ANSCO. Nevertheless, no developmental delay was observed after rainbow trout ELS exposure to HO or LO extracts.

Fig. 4 Methylphenanthrene concentrations drove PAH fractions toxicity in rainbow trout early life stages. **(a)** Variable factor map and **(b)** individual factor map. PCA representing normalized coefficients on the first two axes (axis 1, 70.0 %; axis 2, 15.1 %) for nine variables: five toxicity variables and four PAH gravel concentrations. Toxicity endpoints referred to *HR* hatching rate, *LengthT* larvae total length, *D* developmental abnormalities, *Comet* percentage tail DNA, and *MortHH* half-hatched mortality. PAH gravel concentrations refer to *MP* methylphenanthrene, *DMP* dimethylphenanthrene, *TMP* trimethylphenanthrenes, and *MDBT* methylidibenzothiophene



Petrogenic fractions but not pyrolytic one also resulted in a significant increase of tail DNA in peripheral blood cells from exposed larvae. Comet assay detects repairable DNA damages such as single/double strand breaks and also alkali labile sites. Comet assay in fish blood cells have been shown to be a sensitive and convenient assay to measure DNA damage induced by genotoxic pollutants in aquatic environment (De Andrade et al. 2004; Frenzzilli et al. 2009). Conversely, no significant increase of micronucleated blood cells was observed. The MN assay measures irreversible DNA damage, resulting from clastogenic (chromosomal breakage) or aneugenic events (mitotic spindle dysfunction) occurring later in the time course of the mutagenesis process (Udroiu 2006). We can assume that when MN assay was performed (350 DD), DNA damage may not have been definitively fixed in the larva blood cells. These results can be explained not only by the kinetics of induction and repair of DNA strand breaks (Carls et al. 1999; Nahrgang et al. 2010) but also by the low mitotic index of peripheral blood cells (Fujiwara et al. 2001; Wang et al. 2010).

It is likely that PAH metabolites and reactive oxygen species may be responsible for the DNA damage recorded in this study (Regoli et al. 2002; Fallahtafi et al. 2012). We could expect MN, mutations, and tumor induction at later developmental stages as

reported after fish exposure to *Erika* oil, *Statford* oil, or organic extract from the Seine river sediment (Amat et al. 2006; Baršienė et al. 2006; Cachot et al. 2007). However, aromatic extracts may also contain traces of other chemicals which can also be toxic to fish in particular saturated hydrocarbons or mono-aromatic compounds (González-Doncel et al. 2008). In fact, *Arabian light* crude oil contains 75 % of saturated hydrocarbons, 15 % of aromatic hydrocarbons, and 10 % of resins and asphaltenes (Wang et al. 2003). *Erika* oil contains 22 % of saturated hydrocarbons, 42 % of aromatic hydrocarbons, and 35 % of resins and asphaltenes (Baars 2002). Although most of them were removed during the extraction process, some traces may remain in the aromatic fraction.

Toxicity did not increase linearly with increasing proportions of high molecular weight PAHs. Indeed, the PY fraction which contains a high proportion of high molecular weight PAHs was the least toxic mixture to rainbow trout ELS. The LO fraction, mainly composed of two and three ring PAHs, was moderately toxic. Finally, the HO fraction, mainly composed of two to four ring PAHs, was the most toxic fraction. The toxicity gradient illustrated in Fig. 4b highlights differences in toxicity according to the proportion and concentration in methylated phenanthrenes and methylated anthracenes.

Genotoxicity and developmental toxicity of the PAH mixtures are mainly driven by the concentration and proportion of three ring methylated-PAHs that predominate in the HO fraction. It is now well-documented that different PAH compounds have different modes of action and toxicity that are assumed not to be additive (Billiard et al. 2008). Low molecular weight PAHs act preferentially through the narcosis pathway while high molecular weight PAHs involve binding to aryl hydrocarbon receptor AhR (Di Toro et al. 1991; Wassenberg and Di Giulio 2004). It has been recently demonstrated that three ring compounds can also act through an unknown AhR-independent pathway (Hawkins et al. 2002; Incardona et al. 2005). Previous works reported the highest toxicity to fish ELS of three ring compounds either alone (Incardona et al. 2004) or in mixture (Sundberg et al. 2005; Incardona et al. 2009). Based on their embryo-larval toxicity, an alkyl-phenanthrene model was recently developed on methylated-phenanthrene from two to four carbons to better evaluate the complex toxicity of PAH mixtures (Barron et al. 2004). Alkyl-phenanthrene toxicity can be explained (1) by indirect toxicity due to reactive oxygen species production and (2) by direct toxicity of the compound itself or its metabolites (Billiard et al. 2008). Indeed, biotransformation of alkyl-phenanthrenes generates highly toxic metabolites by hydroxylation on double bonds of rings or on the alkyl side chains. These molecules are able to disrupt the cellular homeostasis resulting in cytotoxicity directly related to the genotoxic potency of the compound (Buczynski and Penning 2000). *Para*-substituted quinones appear to be one of the most toxic hydroxylated metabolites of alkyl-phenanthrenes to fish ELS (Fallahatfi et al. 2012).

In an ecological point of view, the exposure conditions in our experiments are consistent with the natural habitat conditions of salmonid embryos and environmental concentrations of PAHs in contaminated sediments (Cachot et al. 2006; Karlsson et al. 2008). Indeed, salmonid embryos are usually buried into the gravel of the river bed throughout their embryonic development. This exposure design did not consider the phototoxicity of PAHs since embryos were incubated in complete darkness. This could have led to underestimating PAH toxicity to rainbow trout ELS (Barron et al. 2003; Hatlen et al. 2010).

It was shown here that direct exposure of rainbow trout ELS to spiked gravels is a suitable approach to assess toxicity of PAHs. Further experiments will be carried out to validate this approach with other hydrophobic pollutants.

Conclusion

To summarize, this study succeeded in designing a suitable and environmentally realistic protocol for hydrophobic compound testing with *Oncorhynchus mykiss* ELS. Teratogenic and genotoxic effects of three PAH mixtures were reported.

Toxicity of PAH mixtures was positively related to the concentrations of methylphenanthrenes and methylanthracenes. Our data support PAH mixtures containing high amount of alkyl-phenanthrenes are likely a threat for fish early life stages.

Acknowledgments This work was funded by the French National Agency for Research, program “Contaminant, Ecosystème et Santé,” in the frame of the ConPhyPoP (2009–002) research project. Equipment was funded by GDR EXECO, Aquitaine Region, and CPER A2E. This project is cofinanced by the European Union with the European fund of regional development. Florane Le Bihan received a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors wish to thank CEDRE for providing the oils used in this study. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence continental to coastal ecosystems.

References

- Amat A, Burgeot T, Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A (2006) DNA adducts in fish following an oil spill exposure. *Environ Chem Lett* 4(2):93–99
- Baars B-J (2002) The wreckage of the oil tanker “Erika”—human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. *Toxicol Lett* 128(1–3):55–68. doi:10.1016/S0378-4274(01)00533-1
- Barbee GC, Barich J, Duncan B, Bickham JW, Matson CW, Hintze CJ, Autenrieth RL, Zhou G-D, McDonald TJ, Cizmas L, Norton D, Donnelly KC (2008) *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicol Environ Saf* 71(2):454–464
- Barron MG, Carls MG, Short JW, Rice SD (2003) Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to pacific herring eggs and larvae. *Environ Toxicol Chem* 22(3):650–660
- Barron MG, Carls MG, Heintz R, Rice SD (2004) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol Sci* 78(1): 60–67. doi:10.1093/toxsci/kfh051
- Baršienė J, Dedonytė V, Rybakovas A, Andreikėnaitė L, Andersen OK (2006) Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat Toxicol* 78(0):S99–S104. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.022
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P (1998) PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar Pollut Bull* 36(8):577–586. doi:10.1016/S0025-326X(98)00014-9
- Belanger SE, Balon EK, Rawlings JM (2010) Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat Toxicol* 97(2):88–95
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 105(1):5–23. doi:10.1093/toxsci/kfn303
- Brinkmann M, Hudjetz S, Kammann U, Hennig M, Kuckelkorn J, Chinoraks M, Cofalla C, Wiseman S, Giesy JP, Schäffer A, Hecker M, Wölz J, Schüttrumpf H, Hollert H (2013) How flood events affect rainbow trout: evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat Toxicol* 128–129(0):13–24. doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.010
- Brinkworth LC, Hodson PV, Tabash S, Lee P (2003) CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene. *J Toxicol Environ Health A* 66:627–646
- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, Le Menach K, Garrigues P (2000) Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J Anal Chem* 367(2):165–171. doi:10.1007/s002160051618
- Burczynski ME, Penning TM (2000) Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* 60(4):908–915
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257–267
- Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environ Sci Technol* 41(22):7830–7836
- Carls MG, Meador JP (2009) A perspective on the toxicity of petrogenic PAHs to developing fish embryos related to environmental chemistry. *Hum Ecol Risk Assess* 15(6):1084–1098
- Carls MG, Thedinga JF (2010) Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Mar Environ Res* 69(5):318–325
- Carls MG, Rice SD, Hose JE (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18(3):481–493. doi:10.1002/etc.5620180317
- Cook PM, Robbins JA, Endicott DD, Lodge KB, Guiney PD, Walker MK, Zabel EW, Peterson RE (2003) Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century. *Environ Sci Technol* 37(17):3864–3877. doi:10.1021/es034045m
- Couillard CM (2002) A microscale test to measure petroleum oil toxicity to mummichog embryos. *Environ Toxicol* 17(3):195–202. doi:10.1002/tox.10049
- De Andrade VM, De Freitas TRO, Da Silva J (2004) Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 560(1):57–67
- Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA, Paquin PR (1991) Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ Toxicol Chem* 10(12):1541–1583. doi:10.1002/etc.5620101203
- EC (2010) Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. vol L276. Official Journal of the European Union,
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97(2):79–87
- Escarti E, Porte C (1999) Biomonitoring of PAH pollution in high-altitude mountain lakes through the analysis of fish bile, vol 33. American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS
- Fallahtafti S, Rantanen T, Brown RS, Snieckus V, Hodson PV (2012) Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 106–107(0): 56–64. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.007
- Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments (review). *Mutat Res Rev Mutat Res* 681(1):80–92
- Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Sakamoto T, Okamoto N, Nakayama I, Abe S (2001) Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica* 111:77–89
- Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H (2003) Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar Pollut Bull* 46(4):481–49
- González-Doncel M, González L, Fernández-Torija C, Navas JM, Tarazona JV (2008) Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 87(4): 280–288. doi:10.1016/j.aquatox.2008.02.013
- Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A, Akkanen J, Slootweg T, Mäenpää K, Leppänen M, Agbo S, Gallampois C, Kukkonen JK (2012) Bioavailability of organic contaminants in freshwater environments. In: Emerging and priority pollutants in rivers. The handbook of environmental chemistry. Springer, Heidelberg, pp 25–53. doi:10.1007/978-3-642-25722-3_2
- Hatlen K, Sloan CA, Burrows DG, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP (2010) Natural sunlight and residual fuel oils are an acutely lethal combination for fish embryos. *Aquat Toxicol* 99(1):56–64
- Hawkins SA, Billiard SM, Tabash SP, Brown RS, Hodson PV (2002) Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 21(9):1845–1853. doi:10.1002/etc.5620210912
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinane N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 399(2):125–133
- Heintz RA, Short JW, Rice SD (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environ Toxicol Chem* 18(3): 494–503. doi:10.1002/etc.5620180318
- Hicken CE, Linbo TL, Baldwin DH, Willis ML, Myers MS, Holland L, Larsen M, Stekol MS, Rice SD, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proc Natl Acad Sci* 108(17):7086–7090. doi:10.1073/pnas.1019031108
- Hodson PV, Qureshi K, Noble CAJ, Akhtar P, Brown RS (2007) Inhibition of CYP1A enzymes by β -naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 81(3):275–285. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.012
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196(2): 191–205
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK, Scholz NL (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspect* 113(12):1755–1762
- Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK, Scholz NL (2009) Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ Sci Technol* 43(1):201–207. doi:10.1021/es80270t
- Karlsson J, Sundberg H, Åkerman G, Grunder K, Eklund B, Breitholtz M (2008) Hazard identification of contaminated sites—ranking potential toxicity of organic sediment extracts in crustacean and fish. *J Soils Sed* 8(4):263–274. doi:10.1007/s11368-008-0015-3

- Kocan RM, Matta MB, Salazar SM (1996) Toxicity of weathered coal tar for shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) embryos and larvae. Arch Environ Contam Toxicol 31:161–165
- Liu JJ, Wang XC, Fan B (2011) Characteristics of PAHs adsorption on inorganic particles and activated sludge in domestic wastewater treatment. Bioresour Technol 102:5305–5311
- Milinkovitch T, Kanan R, Thomas-Guyon H, Le Floch S (2011a) Effects of dispersed oil exposure on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the mortality of juvenile *Liza ramada*. Sci Total Environ 409(9):1643–1650. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.009
- Milinkovitch T, Ndiaye A, Sanchez W, Le Floch S, Thomas-Guyon H (2011b) Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. Aquat Toxicol 101(1):155–164. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.013
- Milinkovitch T, Imbert N, Sanchez W, Le Floch S, Thomas-Guyon H (2013) Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: biomarkers in the heart of the juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). Ecotoxicol Environ Saf 88(0):1–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.10.029
- Nahrgang J, Camus L, Carls MG, Gonzalez P, Jönsson M, Taban IC, Bechmann RK, Christiansen JS, Hop H (2010) Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. Aquat Toxicol 97(3):234–242. doi:10.1016/j.aquatox.2009.11.003
- Olive PL, Banáth JP (1995) Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the Comet Assay and a DNA crosslinking agent. Exp Cell Res 221(1):19–26. doi:10.1006/excr.1995.1348
- Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, Winston GW (2002) Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. Mar Environ Res 54:419–423. doi:10.1016/S0141-1136(02)00146-0
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175(1):184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Sundberg H, Ishaq R, Akerman G, Tjarnlund U, Zebuhr Y, Linderöth M, Broman D, Balk L (2005) A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. Toxicol Sci 84(1):63–72. doi:10.1093/toxsci/kfi067
- Udroiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. Aquat Toxicol 79:201–204
- Wang Z, Hollebone BP, Fingas M, Fieldhouse B, Sigouin L, Landriault M, Smith P, Noonan J, Thouin G (2003) Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. US EPA
- Wang B, Liu Y, Chen X, Fan Z (2010) Amitosis-like nuclear division in erythrocytes of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J Fish Biol 76:1205–1211. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02556.x
- Wassenberg DM, Di Giulio RT (2004) Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. Environ Health Perspect 112(17):1658–1664

3 Article n°5 & 6: Toxicité des trois mélanges de HAP sur les jeunes stades de médaka japonais

Des nouvelles méthodes ont été développées dans le Chapitre II. Le développement d'une matrice sédimentaire de référence dans l'article n° 1 et de nouveaux marqueurs de toxicité dans l'article n° 3 ont permis d'améliorer la sensibilité du test MELAc. Ces outils ont été appliqués à l'évaluation de la toxicité de trois fractions HAP (**articles n° 5 et 6**). Ces derniers étaient issus d'un extrait de sédiment contaminé en HAP de l'estuaire de la Seine (Oissel, France) et de deux pétroles *Arabian Light* et *Erika*. Ces mêmes mélanges avaient déjà été testés précédemment vis à vis des SPD de truite arc-en-ciel dans l'article n°3. Basé sur le concept d'additivité, les équivalents toxiques ont été développés pour évaluer le risque de contaminants. Cependant certains HAP sont de faibles agonistes de l'Ahr et agissent indépendamment de l'activation de l'Ahr. De ce fait l'évaluation des HAP en mélange par les méthodes d'équivalents toxiques est remise en question.

La première partie de ce travail est présentée dans l'**article n° 5** et propose d'évaluer et de comparer l'embryotoxicité des trois différentes fractions de HAP vis à vis du médaka japonais. Trois concentrations différentes ont été testées pour chacune des fractions : 0,3X, 1X et 3X, où 1X correspond à une concentration environnementale en HAP de 10 µg.g⁻¹ p.s.. Différents paramètres ont été mesurés : la survie, le retard d'éclosion, le succès d'éclosion, les malformations morphologiques, l'activité natatoire des larves et les dommages à l'ADN sur larves entières par le test des comètes et des MN. La mesure de ces paramètres sur les individus témoins était similaire à ceux des expériences précédentes présentées dans les articles n° 1, 2 et 3. Par ailleurs, moins de 2 % des individus exposés à 3X de la fraction *Arabian Light* et 1X et 3X de la fraction *Erika* ont éclos. Ces conditions n'ont donc pas pu être considérées pour le reste des analyses. De nombreuses malformations se rapportant au syndrome du BSD telles que l'apparition d'œdèmes, d'hémorragies et de déformations de la colonne vertébrale ont été révélées. Le test des micronoyaux a mis en évidence des dommages irréversibles à l'ADN causés par l'exposition aux fractions pyrolytique et *Arabian Light*, alors que le test des comètes n'a pas démontré d'accroissement significatif de dommages réversibles à l'ADN. L'exposition aux trois fractions de HAP a aussi provoqué une hyperactivité natatoire des larves de médaka.

Ces résultats ont ensuite été comparés au travail précédent effectué sur les mêmes fractions de HAP pyrolytiques, *Arabian Light* et *Erika* vis à vis d'embryons et de larves de truite présenté dans l'article n° 4. Les échantillons et les manipulateurs étaient identiques dans les deux études mais il y avait des différences non négligeables entre les deux études qui ont limité leur comparaison. Par exemple, la matrice d'exposition était différente, l'exposition des truites a été réalisée à l'obscurité alors que certains HAP sont photo-activables, ou encore la température et la salinité étaient plus importantes lors de l'exposition des embryons de médaka. Ces facteurs ont pu modifier les propriétés physico-chimiques des contaminants. Malgré ces différences, la fraction pyrolytique s'est avérée la moins toxique pour les deux espèces. Les fractions pétrogéniques *Arabian Light* et *Erika* ont induit la majorité des effets chez les embryons et larves de poissons. La fraction pyrolytique était composée en majorité de HAP à haut poids moléculaire alors que les fractions pétrogéniques étaient composées en majorité de HAP de faible poids moléculaire et HAP alkylés. Ces derniers sont reconnus pour contrôler la toxicité des HAP en mélange. L'exposition aux fractions de HAP a affecté la biométrie, la morphologie et l'intégrité de l'ADN des deux espèces. De plus, les larves de

médaka japonais ont fixé les dommages à l'ADN détecté avec le test des MN alors que les larves de truite arc-en-ciel ont seulement exhibé des dommages réparables. Les SPD de médaka se développent naturellement plus rapidement que la truite et de ce fait possèdent un taux de renouvellement cellulaire plus élevé. Cela aurait conduit à une fixation précoce des dommages à l'ADN irréversible et une réparation des dommages réversibles chez le médaka. Les deux tests de génotoxicité MN et comète sont complémentaires et, lorsqu'ils sont réalisés ensemble, proposent une évaluation complémentaire de la réponse des organismes aux composés génotoxiques. Concernant les trois fractions de HAP, les SPD de truite arc-en-ciel étaient significativement plus sensibles à la fraction *Erika* qu'à la fraction *Arabian Light*. Cela n'a pas été statistiquement démontré pour le médaka japonais. La différence majeure entre ces deux fractions pétrogéniques est leur proportion en alkyl-naphtalènes plus importante pour l'*Arabian Light*, et en alkyl-phénanthrènes pour l'*Erika*.

L'approche des équivalents toxiques a été appliquée aux trois fractions aromatiques. Deux méthodes de calcul ont été utilisées en considérant comme composé de référence le BaP et son potentiel génotoxique, ou la dioxine et son potentiel de liaison à l'Ahr. D'après ces calculs la fraction pyrolytique est apparue la plus toxique. Ceci était en opposition avec les résultats des deux tests embryo-larvaires. Les méthodes d'évaluation de toxicité basées sur les équivalents toxiques ne considèrent qu'un mode d'action restreint. Elles ne prennent pas en compte les modes d'action non spécifiques ou indépendants de la liaison à l'Ahr des HAP de faibles et moyens poids moléculaire présents en majorité dans les fractions pétrogéniques. En considérant les facteurs d'équivalents toxiques actuels, cette approche n'a pas été adaptée à l'évaluation de la toxicité de mélanges complexes de HAP envers les SPD de poisson.

La contamination chimique ainsi que les réponses en terme d'expression de gènes cibles sont détaillées dans la deuxième partie de l'étude afin d'apporter des éléments pour évaluer la biodisponibilité, la bioaccumulation et les mécanismes d'action des sédiments contaminés en HAP. Ces résultats sont présentés dans l'**article n° 6**. Au vu des effets létaux observés aux concentrations 1X et 3X, la concentration 0,3X a été sélectionnée pour l'exposition réalisée dans cette deuxième partie de l'étude. Les processus de sorption et de désorption des HAP depuis le sédiment et les particules sédimentaires contrôlent les concentrations en HAP dans l'eau interstitielle et donc la fraction en contaminant biodisponible pour les organismes. Afin de la caractériser, les concentrations en HAP totaux incluant les HAP méthylés et non-méthylés ont été mesurées dans les sédiments, l'eau et les tissus embryonnaires au début de l'exposition, au sixième jour, et au dixième jour correspondant à la fin de l'exposition.

Le scénario d'exposition utilisant des sédiments enrobés est apparu un moyen efficace pour distribuer des doses réalistes de contaminants hydrophobes. L'exposition aux HAP peut avoir lieu par différentes voies d'exposition soit par la colonne d'eau pour les HAP dissous soit par un contact direct avec le sédiment pour les HAP adsorbés sur les particules. Les HAP, de par leur caractère hydrophobe, ont la capacité de traverser les membranes biologiques et de se bioaccumuler dans les tissus lipophiles. Plusieurs études ont rapporté que la perméabilité d'un composé à travers les membranes biologiques augmentait avec le caractère lipophile d'une substance. Cependant dans ce travail, ce sont les composés de faible poids moléculaire qui ont été détectés en majorité dans les tissus des embryons exposés à la fraction aromatique *Erika*. D'autres études sur les bivalves ont aussi rapportés une bioaccumulation plus importante des HAPs légers comparés aux HAP lourds. La biodisponibilité des HAPs lourds pourrait avoir été limitée par la taille des molécules.

L'analyse des expressions géniques a été réalisée avec la méthode RT-qPCR et les gènes *β-actin* et *rpl7* ont été choisis comme gènes de références. L'activité de 15 gènes cibles a été étudiée chez les embryons âgés de 6 jours et chez les larves nouvellement écloses. Le gène codant pour le cytochrome P450 1A1 a été choisi comme biomarqueur d'exposition aux HAP. Son induction a suggéré la biotransformation des composés au cours des jeunes stades de développement. Les HAP peuvent activer le gène *cyp1A* en se liant à l'Ahr, leur affinité pour ce récepteur variant entre les molécules. L'activation de l'Ahr pourrait expliquer en partie les malformations larvaires observées précédemment. Pour approfondir les mécanismes d'action des HAP sur le développement embryonnaire, la voie *wnt1/ β-catenin* a également été considérée mais aucune modification n'a été observée. Par ailleurs, la surexpression de la superoxyde dismutase cytoplasmique *sod Cu* pourrait traduire une production d'espèces réactives à l'oxygène due à l'exposition des individus aux HAP. De plus l'augmentation de la transcription du gène *coxI* a suggéré une altération du métabolisme mitochondrial et pourrait dénoter une augmentation de la demande en énergie de la cellule pour combattre la contamination. L'augmentation conjointe des niveaux de transcription des gènes *coxI* et *12s* pourrait indiquer que le nombre de mitochondries augmente pour maintenir le niveau de production d'ATP. D'autre part, la dérégulation du gène *p53* pourrait avoir de multiples conséquences sur la prolifération et la différenciation cellulaire, l'homéostasie des cellules et l'intégrité de l'ADN. La mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN et d'apoptose n'a pas été confirmée par les gènes impliqués étudiés qui ont révélés une expression constante quelque soit le traitement. Par ailleurs, la dérégulation du gène codant pour le récepteur à l'acide rétinoïque pourrait expliquer l'altération de la locomotion des larves observée dans l'article n° 5. La modulation de l'expression du gène *cyp19b* codant pour la synthèse de l'aromatase B semblerait révéler le potentiel de perturbateur endocrinien des fractions. Une activité anti-œstrogénique a été observée au stade larvaire et œstrogénique au stade embryonnaire. Ces effets associés aux récepteurs œstrogéniques, à l'acide rétinoïque et aryl hydrocarbène pourraient également élucider la perturbation du comportement des larves exposées.

Les résultats obtenus dans l'article n° 6 permettent d'expliquer en partie le mode d'action des mélanges de HAP chez les jeunes stades de poissons, notamment les effets sur le développement et le comportement. Les mélanges d'origine pyrolytique et pétrogénique ont modulés des gènes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, des œstrogènes, et de l'acide rétinoïque.

ARTICLE V

Référence

Le Bihanic F, Clérandeau C, Menach K, Morin B, Budzinski H, Cousin X, Cachot J (2014): Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. Environ Sci Pollut Res, 1-12

Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka

Florane Le Bihanic · Christelle Clérandeau ·
Karyn Le Menach · Bénédicte Morin ·
Hélène Budzinski · Xavier Cousin · Jérôme Cachot

Received: 31 October 2013 / Accepted: 19 February 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract In aquatic environments, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mostly occur as complex mixtures, for which risk assessment remains problematic. To better understand the effects of PAH mixture toxicity on fish early life stages, this study compared the developmental toxicity of three PAH complex mixtures. These mixtures were extracted from a PAH-contaminated sediment (Seine estuary, France) and two oils (*Arabian Light* and *Erika*). For each fraction, artificial sediment was spiked at three different environmental concentrations roughly equivalent to 0.5, 4, and 10 μg total PAH g^{-1} dw. Japanese medaka embryos were incubated on these PAH-spiked sediments throughout their development, right up until hatching. Several endpoints were recorded at different developmental stages, including acute endpoints, morphological abnormalities, larvae locomotion, and genotoxicity (comet and micronucleus assays). The three PAH fractions delayed hatching, induced developmental abnormalities, disrupted larvae swimming activity, and damaged DNA at environmental concentrations. Differences in toxicity levels, likely related to differences in PAH proportions, were highlighted between fractions. The *Arabian Light* and *Erika* petrogenic fractions, containing a high proportion of alkylated PAHs and low molecular weight PAHs, were more toxic to Japanese medaka early life stages than the pyrolytic fraction.

This was not supported by the toxic equivalency approach, which appeared unsuitable for assessing the toxicity of the three PAH fractions to fish early life stages. This study highlights the potential risks posed by environmental mixtures of alkylated and low molecular weight PAHs to early stages of fish development.

Keywords Developmental abnormalities · Comet assay · Micronucleus assay · Larvae locomotion · Oil extract · Pyrolytic extract · Medaka embryo-larval assay

Abbreviations

PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
BSD	Blue sac disease
dpf	Days post fertilization
MELAc	Medaka Embryo-Larval Assay with sediment contact exposure
dw	Dry weight
ERS	Egg rearing solution
ELS	Early life stages
MEM	Minimum Essential Medium
MN	Micronucleus
PY	Pyrolytic
HO	Heavy oil
LO	Light oil
TEF	Toxic equivalent factor
TEQ	Toxic equivalency

Responsible editor: Henner Hollert

F. Le Bihanic · C. Clérandeau · K. Le Menach · B. Morin ·
H. Budzinski · J. Cachot (✉)
UMR CNRS 5805 EPOC, University of Bordeaux, avenue des
Facultés, 33405 Talence Cedex, France
e-mail: j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr

X. Cousin
IFREMER, Ecotoxicology laboratory, Place Gaby Coll, BP7,
17137 L'Houmeau, France

X. Cousin
INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Introduction

While environmental contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is steadily increasing, assessing the actual risk posed by this contamination is problematic. In fact, PAHs occur mostly in complex mixtures in aquatic

environments. Different methods have been proposed to assess the combined effects of these compounds. Assuming dose additivity, the concept of toxic equivalency was initially developed to evaluate the risk of dioxin-like compounds (Van den Berg et al. 2006; Safe 1993). This method consists of grading the toxic potency of different compounds based on a single reference toxicant. Toxic equivalent factor (TEF) values based on dioxin assume that effects are mediated by binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a cytosolic transcription factor (Barron et al. 2004b). TEF values, using benzo[*a*]pyrene as a reference, focus on the carcinogenic properties of the studied compounds (Nisbet and LaGoy 1992). However, some recent studies have reported toxicity of some weak AhR agonist PAHs that was independent of AhR activation (Incardona et al. 2006). This calls into question complex PAH mixture assessment based on toxic equivalencies. Furthermore, the weak solubility of PAHs is also problematic to assess their toxicity to aquatic organisms. Indeed, waterborne exposure to these hydrophobic compounds is limited and does not reflect their actual bioavailability in natural conditions (Hollert et al. 2003; Kiparissis et al. 2003).

The European regulation for Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) calls for the replacement, reduction, and refinement of the use of animals for scientific purposes (EC 2006). Fish embryo-larval assays fulfill ethical requirements, providing an alternative to non-mammalian models (Embry et al. 2010; Strähle et al. 2012). Moreover, the transparency of the chorion enables direct and non-invasive observations during embryogenesis. Toxic effects of PAHs on fish early life stages (ELS) generally include both genotoxic and developmental effects. A common syndrome reported in dioxin and PAH-exposed fish embryos is blue sac disease (BSD), which is characterized by pericardial or peritoneal edemas, spinal curvature, craniofacial abnormalities, or altered heart development (Rhodes et al. 2005; Kim and Cooper 1999). It has previously been shown that pyrolytic PAH mixtures from contaminated sediment in the Seine River induced BSD—as well as mutations and tumors—in the transgenic Japanese medaka *Lambda cII* (Cachot et al. 2007). Petrogenic PAH mixtures also led to BSD, along with genetic damage and mortality among different species of fish embryos (Couillard 2002; Carls et al. 1999; Colavecchia et al. 2004).

The MELAc (Medaka Embryo-Larval Assay with sediment contact exposure) was selected in this study to improve and complement the risk assessment of hydrophobic compounds (Vicquelin et al. 2011). The objective of our work was firstly to evaluate and compare the toxicity of three PAH fractions with different compositions: (1) a pyrolytic (PY) fraction from a contaminated sediment, (2) a petrogenic PAH fraction from a heavy oil (HO) *Erika*, and (3) a second petrogenic PAH fraction from a type of light crude oil, *Arabian Light* (LO). Several endpoints were recorded, including survival, hatching delay, hatching success, developmental

abnormalities, larvae swimming activity, and DNA damage (comet and micronucleus assay). The micronucleus assay was carried out for the first time on cells extracted from the entire larvae in order to evaluate DNA damage in the whole body and not in a specific tissue.

Strong relationship has been shown between the results of acute toxicity tests in adults and in embryos for several fish model species (reviewed by Belanger et al. 2013). It is thereby questionable if the results obtained in this study can be extrapolated to other species. This is an important question since different model species are used in fish ELS assays (see for instance Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)'s guidelines 212). Therefore, an attempt was made in this study to compare ELS toxicity patterns and sensitivity between Japanese medaka (the present study) and another model fish, rainbow trout (Le Bihanic et al. [this issue](#), *in revision*).

Materials and methods

PAH fraction samples

The PY PAH fraction was extracted from contaminated sediment in the Seine River, sampled in March 2010 in Oissel (Normandy, France). CEDRE (Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution) provided both the *Arabian Light* crude Oil (LO) and the *Erika* HO. The PAH fraction from the sediment sample was extracted using microwaves with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). The two oils were dissolved in pentane to induce asphaltene precipitation. Both the sediment extract and two pentane extracts were then concentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas city, USA). All three PAH samples were then purified using alumina columns (preparative liquid chromatography) and eluted with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). Following a further concentration step, aliphatic fractions obtained after elution on silica columns with pentane were discarded and aromatic fractions obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents were kept. Atlantic Labo (Bruges, France) provided the pentane solvent. Finally, aromatic fractions were concentrated, with the final fractions kept in dichloromethane (stored at −20 °C) for spiking experiments. Each step in the process was gravimetrically controlled to prevent PAH losses and allow results to be expressed in terms of quantity of the original substance (i.e., sediment or oils).

Artificial sediment spiking

The artificial sediment was composed of 92.5 % silica sand, 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat, and 5 % kaolin clay (Le Bihanic et al. [this issue](#), 2014). For each PAH fraction, the

sediment was spiked to achieve 0.3×, 1×, and 3× concentrations, with dichloromethane as a solvent (Biosolve, Valkenswaard, the Netherlands). 1× concentration refers to the sum of PAHs in sediments from the upper Seine estuary of 10 µg g⁻¹ (Cachot et al. 2006). In fact, due to the relatively moderate sorption efficiency of PAHs on particles, the actual PAH concentrations in sediments were much lower. Measured PAHs included 21 non-substituted PAHs (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, dibenzo[*bd*]-thiophene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene, triphenylene, chrysene, benzo[*b*]naphtho[2,1-*d*]thiophene, benzo[*b+k+j*]fluoranthene, benzo[*e*]pyrene, benzo[*a*]pyrene, perylene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, dibenzo[*ah*]anthracene, dibenzo[*ac*]anthracene, benzo[*ghi*]perylene), methyl naphthalenic and methyl phenanthrenic compounds. PAHs spiked onto sediment were extracted using microwaves. PAHs were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Spiking and PAH analysis methods are detailed in (Le Bihanic et al. this issue, 2014).

Embryo exposure

Gis-Amagen (INRA, Jouy-en-Josas, France) provided eggs at early gastrula. One day post fertilization (dpf) embryos were placed onto the spiked sediment surface throughout embryonic development and until hatching. The exposure unit, replicated 3 times for each treatment, contained 25 embryos, 3 g dw of sediment, and 3 mL of egg rearing solution (ERS). Experiments took place in climate chamber (Snijders Scientific, Tilburg, the Netherlands) at 26±0.3 °C with a photoperiod light: dark of 12 h: 12 h, 5,000 lx white light. Dissolved oxygen concentration in ERS medium was measured daily using a Fibox 3 fiber-optic oxygen mini-sensor (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany). Exposure was stopped at the peak of hatching, when more than half of individuals hatched in the three replicates of a single condition (11 dpf for experiment 1 and 12 dpf for experiment 2). After hatching, yolk-sac larvae were observed and transferred into glass beakers containing 20 mL of a water mixture (dechlorinated water mixed with distilled water 1:2 v/v aerated for 24 h). After exposure, non-hatched embryos were transferred into new plastic petri dishes containing 3 mL ERS without sediment. Yolk-sac larvae were not fed during the experiment. Three days after the peak hatching period, the experiment was stopped by euthanizing all remaining larvae and embryos with a lethal dose of 120 mg L⁻¹ ethyl 4-aminobenzoate (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). For convenience, toxicity tests on PAH fractions were divided into two experiments. The first experiment assessed PY PAH fraction toxicity, while the second focused on LO and HO PAH fraction toxicity. The two experiments were conducted under identical conditions.

Phenotypic effect measurements

Dead embryos and larvae were recorded daily and immediately removed to avoid alteration of the medium. Embryos that died within the first 24 h of the test (0 to 4 %) were not taken into consideration for our calculations, as their death was likely to have been due to transportation stress. Heartbeat measurements were taken at room temperature (23±1 °C) from 7 dpf embryos. Heartbeats were measured over three 20-s periods for the same embryo, using a Leica (Nanterre, France) MZ7.5 ×25 microscope and cold light source (Intralux® 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland). Values were summed to obtain cardiac activity measurements in beat min⁻¹ for each embryo. Five individuals were analyzed per replicate. The time for 50 % hatching was reported as hatching T_{1/2}. Head length, total body length, and yolk-sac area were measured between 0 and 24 h after hatching, on 15 randomly selected larvae per condition. Yolk-sac area was measured as the abdominal cavity excluding the swim bladder area and the pericardial area. Swim bladder inflation was also reported. These measurements were taken using a Leica MZ7.5 stereomicroscope with Leica Microsystems software v3.8 (Nanterre, France).

At hatching, 15 randomly selected larvae per replicate were individually examined to record morphological abnormalities and lesions. Observed larvae were photographed at ×25 magnification using a Leica MZ7.5 stereomicroscope coupled with a Leica DFP420C CCD camera (Nanterre, France). Five types of abnormalities and lesions were scored: edema (peritoneal and pericardial); body (scoliosis, lordosis, kyphosis, and fin erosion); craniofacial (jaw and skull abnormalities); ocular (missing eye, cyclopia and dystrophy); cardiovascular (anemia, hemorrhage, ventricle size, blood circulation, heart position). Abnormalities were scored on a scale of 1 to 5 (i.e., 1 point per type of abnormality). One larva could exhibit several abnormality types and/or several abnormalities of the same type (counted once). The percentage of abnormal larvae represented the number of larvae presenting at least one abnormality compared to the total number of examined individuals.

Genotoxicity assays

Comet and micronucleus assays (MN) were performed on the same cell suspension obtained from ten larvae per replicate at 3 days post-hatching (dph). Cells isolated from larvae exposed to solvent sediment were used as negative controls for both assays. Cells were isolated based on a slightly modified version of the method developed by Morin et al. (2011) to enable sufficient number of isolated cells for both assays. Larvae were entirely minced with razor blades and then digested at 37 °C for 45 min, under slight agitation (150 rpm) with 1.25 mg mL⁻¹ dispase II from *Bacillus polymyxa* (Roche,

Meylan, France) in Minimum Essential Medium (MEM) Eagle (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Following centrifugation at 1,000 rpm for 10 min at room temperature, pellets were rinsed in 1 mL of MEM. Cell viability was assessed under a microscope, using the Trypan blue exclusion protocol. Cell suspension viability was above 95 % in all samples, while cell density varied between 1,300–4,900 cell μL^{-1} .

For the comet assay, the protocol of Morin et al. (2011) was followed. Slides were covered with normal melting point agarose 1 % w/w. Two 50- μL gels were laid on slides. The gels were composed of cell suspension of about 500 cell μL^{-1} and 1 % w/w low melting point agarose. After gel hardening and 1-h lysis at 4 °C, slides were placed on an electrophoresis tray and covered with a freshly prepared electrophoresis buffer for 10 min, to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was carried out at 25 V, 300 mA for 10 min. After rinsing, slides were dehydrated in absolute ice-cold ethanol for a further 20 min. Before reading, slides were stained with ethidium bromide (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Comet analysis was performed at $\times 400$ magnification using an Olympus epi-fluorescent microscope (Olympus, Rungis, France) and a grayscale CCD camera (Zeiss, Germany). DNA damage was measured at 100 nuclei per sample using Comet Assay IV (Perceptive instruments, Bury St Edmunds, UK) using blind review analysis. Data was expressed as percentage tail DNA.

For the MN assay, cell suspensions were fixed in a mixed solution of acetic acid: methanol 1:4 v/v and smeared onto slides for a final concentration of 5,000 cell μL^{-1} . Slides were dried overnight at room temperature. Just before reading, slides were stained with an acridine orange solution (0.003 % in PBS) and covered with a glass slip. Readings were obtained using an epifluorescent microscope at $\times 400$ magnification (Olympus, Rungis, France). The frequency of micronucleated cells was manually recorded for 1,000 cells per slide, using blind review analysis by a single observer. A cell was considered micronucleated if the MN was round-shaped, distinct from the main nucleus, its size was less than a third of the main nucleus, and with a similar green staining to the main nucleus (Hayashi et al. 1998). Cells that were non-isolated, stacked, more than binucleated, or orange-red stained were excluded from the test. The MN assay performed on the whole body of larvae and used in the present study is under the rights of the French patent No.1058505 established on 19/10/2010.

Locomotion assay

Our locomotion assay consisted of visual motor response measurements at 4 dph on 12 larvae per treatment replicate. The procedure was adapted from Emran et al. (2008) and Vignet et al. (2013). Larvae were randomly selected and placed into 48-well microplates. Each microplate well

contained 1 larva in 500 μL of mixed water. Larvae were first acclimated for 1 h in the dark at room temperature (23 ± 1 °C). Coordinates were then recorded using an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) for a 50-min analysis cycle in a DanioVision chamber (Noldus, Wageningen, the Netherlands). This 50-min cycle included three periods of 20 min dark, 10 min light, and 20 min dark. Measurements were performed at 23 ± 1 °C using Ethovision 9.0 (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Dynamic subtraction methods were applied with a sampling rate of 25/s, dark contrast 16–255, current frame weight 4, subject size 2–12,500, and no subject contour dilation. To limit background noise, an input filter of minimal distance moved was set at 10 % of the total body larva equivalent to 0.4 mm. Mean velocity, distance swum, and mobility were calculated for each larva and for each light and dark period. Mobility refers to the time period for the totality of the larva area being modified even if the central point did not change. When an area of more than 60 % changed for a given larva, that specimen was considered highly mobile. All microplates were analyzed at identical temperature and detection and acquisition settings. Larvae unable to swim because of morphological abnormalities were not taken into consideration for the locomotion assay.

Statistics

Each condition treatment was identically replicated three times. Each replicate was considered as an independent sample. Since only individuals from two replicates hatched for the $1 \times \text{LO}$ treatment, $N=2$ for endpoints measured on $1 \times \text{LO}$ -exposed larvae. Normality of the data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.01$). Variance homogeneity was evaluated using the Levene test ($p < 0.05$). In case of homogenous variance and normalized data, one-way ANOVA was performed, followed by the Tukey post hoc test ($p < 0.05$). In converse cases, data were analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test ($p < 0.05$). Since hatching rate data distribution of petrogenic-exposed individuals was platykurtic, data underwent an arcsine transformation prior to statistical analysis (Legendre and Legendre 1998). Statistical analyses were performed with Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France).

Toxic equivalency

TEQ were calculated regarding two different reference compounds: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (dioxin) as reviewed by (Barron et al. 2004b) and benzo[*a*]pyrene as described by (Nisbet and LaGoy 1992) and reviewed by (INERIS 2003). In the case of mixtures, TEF values are summed and weighted by the proportion of the compound in a given mixture. Only the 16 USEPA PAHs were taken into

consideration for this calculation. Concentrations of benzo[*j*]-fluoranthene, dibenzo[*ah*]anthracene, and triphenylene were also included in calculation because they co-eluted with US EPA PAHs.

Results

PAH concentrations in spiked sediments

Spiking efficiencies ranged between 17 and 43 % (Table 1). Some PAH molecules were lost during the spiking process, particularly naphthalene and methylnaphthalenic compounds. PAH concentrations in spiked sediments were comparable between fractions and ranged from 0.5 to 0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ for 0.3 \times , from 3.6 to 4.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ for 1 \times and from 7.3 to 11.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ for 3 \times . In contrast, PAH were detected at a very low concentration in control sediment. Alkylated PAH represented about 60 % of measured PAH in LO sediment, 40 % in HO sediment, and less than 10 % in PY sediment. Dissolved oxygen concentration was in average over 85 % in all exposure units.

Acute toxicity

No significant embryonic or larval mortality was observed during exposure to any of the treatments tested (Table 2). For solvents, 0.3 \times LO, 0.3 \times HO, and all PY conditions, hatching rate was above 88 %. However, only 28 % of embryos exposed to 1 \times LO fraction hatched, and less than 2 % of 3 \times LO, 1 \times HO, and 3 \times HO hatched during the experiment. Those last three treatments were therefore not considered for the following observations.

Developmental effects

No treatment effects were observed on embryonic heartbeat or swim bladder inflation in larvae at hatching (Table 2). The two oil fractions did not affect the kinetic of embryo development, although 3 \times PY treatment significantly delayed larvae $T_{1/2}$ hatching up to 1.1 day. There was no significant difference in yolk-sac area between the exposed larvae and the solvent control group. In contrast, exposure to PAH fractions significantly reduced the head length and total length of exposed individuals. Total length was reduced by 0.2 mm for 3 \times PY, 0.3 mm for 0.3 \times LO and 0.3 \times HO, and by 0.7 mm for 1 \times LO. The control larvae abnormality rate ranged between 9 and 18 %. All three PAH fractions induced teratogenicity in medaka ELS. On average, half of 0.3 \times LO-exposed larvae and all larvae exposed to 1 \times LO were abnormal. Although not significantly different from the control group, about a third of individuals exposed to 0.3 \times HO exhibited developmental anomalies. The frequency of deformed larvae increased from

11 to 62 %, while PY fraction increased from 0.3 \times to 3 \times . The spectrum of abnormalities highlighted craniofacial abnormalities as appearing the most frequently. 3 \times PY larvae presented significantly higher rates of edemas, craniofacial, and cardiovascular abnormalities than control larvae. Larvae exposed to 1 \times LO displayed significant increases in edemas, spinal, craniofacial, and cardiovascular abnormalities when compared to the control group. Although PAH concentrations in sediment for a given dose were similar for the three fractions, occurrences of abnormalities were different. Figure 1 presents photographs of the different developmental defects observed in medaka larva exposed to PAH fractions. Larvae exposed to 0.3 \times petrogenic fractions presented several developmental defects, including changes in jaw and spinal curvature. This was comparable to 1 \times PY treatment effects. Edemas and cardiovascular anomalies were induced by 1 \times LO. This was comparable to 3 \times PY treatment effects.

Genotoxicity

The comet assay did not reveal any significant DNA damage to cells from larvae treated with PAH fractions (Fig 2a). Cells from the control larvae presented 2 and 8 % of tail DNA. In contrast, the MN assay highlighted a significant increase in DNA damage to larvae exposed to PY fractions at all concentrations and in 0.3 \times LO-treated larvae (Fig 2b). Exposure to 0.3 \times HO tended to increase the MN frequency for treated larvae, although this was not significant. MN cell frequency in controls ranged between 2.3 and 3.7 ‰.

Locomotion effects

Figure 3 shows the effects of PAH fractions on larvae velocity under dark and light challenges. All larvae followed a similar pattern. After a slight decrease from 0 to 5 min, larvae velocity stabilized and was constant during the first dark period (0 to 20 min). When the light was turned on for a 10-min period (20 to 30 min), larvae activity was slightly increased. In contrast, when the light was extinguished after 30 min, all larvae reacted with a 3–5-fold increase in velocity. Larva velocity then progressively decreased back down to the level of the first dark period. Larvae exposed to PAH fractions swam faster and over longer distances than control larvae. Indeed, 3 \times PY larvae swam 1.9 times more than control larvae during the first dark period (Fig. 4a). Larvae exposed to 0.3 \times LO swam 1.9 times more during the first dark period and 1.3 times more during the light period (Fig. 4b). And 0.3 \times HO larvae swam 1.6 times more during the first dark period. Based on results relating to velocity and distance swum, PAH-exposed larvae were more mobile than control larvae. This was significant for 3 \times PY larvae, which were 2.5 and 1.9 times more mobile than control larvae during the first dark and light periods, respectively (Fig. 4c). 0.3 \times LO larvae were 2.6 and

Table 1 Measured PAH concentrations and dissolved oxygen in the assays

	Solvent	PY			Solvent	LO			HO		
		0.3×	1×	3×		0.3×	1×	3×	0.3×	1×	3×
PAH concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) ($N=1$)	0.022	0.816	3.862	11.779	0.009	0.499	3.618	7.253	0.717	4.039	11.929
Alkylated PAH (%) ($N=1$)	–	6	5	5	–	61	57	66	40	41	42
Spiking efficiency (%) ($N=1$)	–	27	39	39	–	17	38	25	26	43	43
Dissolved O ₂ (%) (mean \pm SD, $N=3$)	90.0 \pm 2.4	89.9 \pm 1.0	88.3 \pm 2.1	87.7 \pm 2.0	87.2 \pm 1.3	87.3 \pm 0.7	85.9 \pm 0.7	88.1 \pm 0.5	86.9 \pm 0.5	88.9 \pm 0.2	88.0 \pm 0.9

1.6 times more mobile than control larvae during the two dark periods (Fig. 4d).

Toxic equivalency

Table 3 presents the TEQs of the three PAH mixtures regarding both benzo[*a*]pyrene and dioxin. In contrast to the observed toxicity on fish ELS described above, these two methods of calculation display the PY fraction as being the most toxic to fish. The PY TEQ value was twice (BaP) and four times (dioxin) as high as the HO fraction. The LO fraction would therefore appear to be the least potent toxic fraction, with a TEQ value nine times (BaP) and five times (regarding dioxin) lower than the HO fraction.

Discussion

In our study, the toxicity of the three different PAH mixtures was evaluated in ELS of Japanese medaka. The experiments satisfied the recommendations set out in the OECD's guidelines for embryo-larval assays in terms of dissolved oxygen concentration (OECD 1992). Survival, heartbeat, biometry, developmental abnormality rate, DNA damage, and larval locomotion of control individuals were within a similar range to that observed in previous studies (Morin et al. 2011; Vicquelin et al. 2011). Variability between experiment 1 and 2 of abnormal larvae and tail DNA percentages in controls could be explained by natural biological variations between the different batches of eggs. This natural variability was already reported and discussed (Lebihanic et al. this issue, 2014). Exposure to the two petrogenic fractions induced lethal effects by preventing individuals from hatching before the end of the experiment at 1× and 3× concentrations. Dimethyl-PAHs and weathered crude oil were also shown to prevent hatching of Japanese medaka embryos and pink salmon embryos (Rhodes et al. 2005; Carls and Thedinga 2010). Numerous developmental effects, such as reduced growth, edemas, anemia, hemorrhages, cessation of blood flow, and body axis deformities were recorded. The spectrum of effects observed

was very similar to the BSD syndrome previously reported in medaka embryos exposed to various PAHs (Rhodes et al. 2005; Vicquelin et al. 2011). Kiparissis et al. (2003) reported edemas, craniofacial deformities, and impaired circulation following embryonic exposure to retene. Mummichog embryos exposed to crude oil contaminated sediment also exhibited reduced body length, pericardial edema, hemorrhages, and spinal deformities (Couillard 2002). BSD syndrome was demonstrated to be triggered by different nonspecific mechanisms, such as narcosis, or via interactions with specific receptors such as the AhR or cardiotoxicity (Billiard et al. 2008). This syndrome evidenced only part of the mode of action of PAH mixtures. The MN assay has been in use for several decades to assess genotoxicity in various fish contaminated with PAHs (Baršienė et al. 2006; Rocha et al. 2009). In this study, the MN assay was carried out for the first time on cells from entire larvae. This assay allowed global assessment of genotoxic damages in the whole body and not only in a specific tissue, as currently performed. It is thus a more valuable endpoint to assess the global health status of a given organism exposed to genotoxicants. Comet assay was also analyzed on entire larvae. Data obtained highlighted irreversible DNA damage caused by two out of three PAH fractions, PY and LO. Similarly, *Oreochromis niloticus* exposed to petroleum refinery effluent exhibited micronuclei as well as binucleate gill epithelial cells and erythrocytes, lobed nuclei, and notched nuclei that complemented MN scoring (Çavaş and Ergene-Gözükara 2005). PAH fractions also activated larvae locomotion both after stabilization of the larvae in dark and under light challenges. Irons et al. (2013) illustrated that fish larvae locomotion in response to chemicals depends on the compound and concentration. A possible explanation for changes to locomotion functions is that PAHs affect the neurotransmitter pathways (Gesto et al. 2009). Endocrine disruptor activities of PAHs have also already been reported (Barron 2002). Interferences of PAHs or their metabolites with hormone system could partly explain hyperactivity in contaminated larvae. Locomotion assays carried out on fish larvae represent a newly expanding method which serves to complement toxicity analysis by providing an integrative response to broad

Table 2 Developmental toxicity of the three PAH fractions after medaka embryos exposure to PAH-spiked sediments

	Experiment 1				Experiment 2						
	Solvent	0.3× PY	1× PY	3× PY	Solvent	0.3× LO	1× LO	3× LO	0.3× HO	1× HO	3× HO
<i>Acute toxicity</i>											
Embryonic survival (%)	94.7±2.3	97.2±4.8	95.9±4.2	100.0±0.0	97.0±2.0	93.3±5.0	96.0±3.3	97.3±1.9	96.0±3.3	98.7±1.9	96.0±0.0
Hatching rate (%)	93.3±2.3	95.8±7.2	94.6±2.5	88.0±12.0	93.3±4.6^a	86.7±10.1^a	28.0±26.2^b	1.3±2.3^{bc}	96.0±4.0^a	1.3±2.3^{bc}	0.0±0.0^c
Larval survival (%)	100.0±0.0	98.6±2.4	98.0±2.8	100.0±0.0	100.0±0.0	98.5±2.6	80.2±21.6	—	100.0±0.0	—	—
<i>Sublethal toxicity</i>											
Heartbeat (beat min ⁻¹)	112.6±3.2	112.3±4.8	116.6±3.1	120.5±3.3	114.1±4.0	117.2±8.2	118.1±7.9	109.4±4.5	116.1±4.4	117.8±2.9	105.5±8.0
Non-inflated swim bladder (%)	64.4±23.4	64.4±13.9	60.0±17.6	82.2±16.8	55.6±7.7	68.9±15.4	56.7±23.6	—	64.4±10.2	—	—
Hatching T _{1/2} (day)	10.8±0.1^A	11.2±0.3^{AB}	11.1±0.1^A	11.9±0.3^B	10.2±0.1	10.2±0.2	10.4±0.1	—	10.4±0.1	—	—
Total length (mm)	4.46±0.05^A	4.47±0.02^{AB}	4.46±0.06^{AB}	4.25±0.0^B	4.64±0.07^a	4.32±0.12^b	3.91±0.01^c	—	4.35±0.05^b	—	—
Head length (mm)	0.92±0.02	0.92±0.02	0.91±0.02	0.92±0.02	0.97±0.03^a	0.92±0.03^{ab}	0.89±0.05^b	—	0.93±0.01^{ab}	—	—
Yolk-sac area (mm ²)	0.48±0.03	0.45±0.02	0.44±0.04	0.43±0.02	0.40±0.03^{ab}	0.39±0.02^{ab}	0.31±0.01^a	—	0.40±0.04^b	—	—
Abnormal larvae (%)	9.0±3.7^A	11.1±3.8^{AB}	22.2±3.8^B	62.2±7.7^C	17.8±7.7^a	48.9±16.8^b	100.0±0.0^c	—	33.3±6.7^{ab}	—	—
Abnormalities (score /5)	0.1±0.1^A	0.1±0.0^A	0.4±0.1^B	1.1±0.1^C	0.2±0.2^a	0.7±0.3^{ab}	3.1±0.3^b	—	0.4±0.1^{ab}	—	—
Abnormalities (%)											
Edema	0.0±0.0^A	0.0±0.0^A	2.2±3.8^A	17.8±0.1^B	0.0±0.0^a	2.2±3.8^a	60.6±8.6^b	—	3.2±3.8^a	—	—
Spinal	2.2±3.8	4.4±7.7	13.3±6.7	20.0±7.7	11.1±7.7^a	24.4±20.4^a	65.2±2.1^b	—	4.4±3.8^a	—	—
Craniofacial	4.6±4.0^A	6.7±6.7^A	13.3±0.0^A	46.7±17.6^B	8.9±10.2^a	24.4±7.7^{ab}	95.5±6.4^b	—	24.4±3.8^{ab}	—	—
Eye	2.2±3.8	0.0±0.0	2.2±3.8	0.0±0.0	0.0±0.0	2.2±3.8	0.0±0.0	—	0.0±0.0	—	—
Cardiovascular	2.2±3.8^A	0.0±0.0^A	8.9±3.8^A	28.9±13.9^B	2.2±3.8 a	17.8±3.8^{ab}	90.9±12.9^b	—	8.9±7.7^{ab}	—	—

Different letters and bold characters refer to significant differences between treatments (mean±SD, N=3, Anova, $p<0.05$)

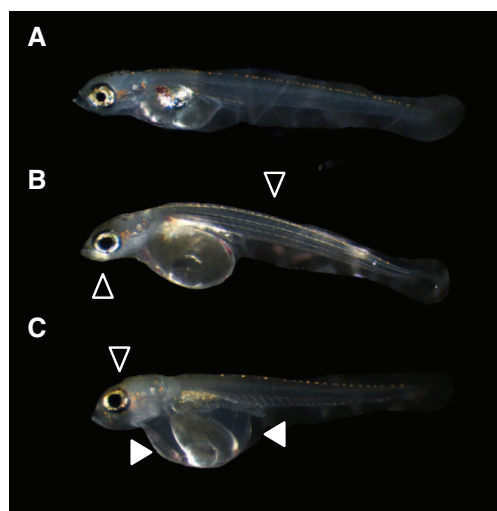


Fig. 1 The PAH fractions induced teratogenicity in medaka larvae following embryo exposure to PAH-spiked sediment. **a** No noticeable developmental abnormality in control larva. **b** Jaw deformity and spinal curvature in 1× PY-exposed larva. **c** Jaw and cranial deformities, pericardial and peritoneal edemas in 3× PY-exposed larva. White arrows indicate pericardial or peritoneal edemas. Black arrows indicate skeleton deformities either craniofacial or spinal

physiological alterations, such as disruption of the central nervous system, vision, skeleton, and muscles (de Esch et al. 2012).

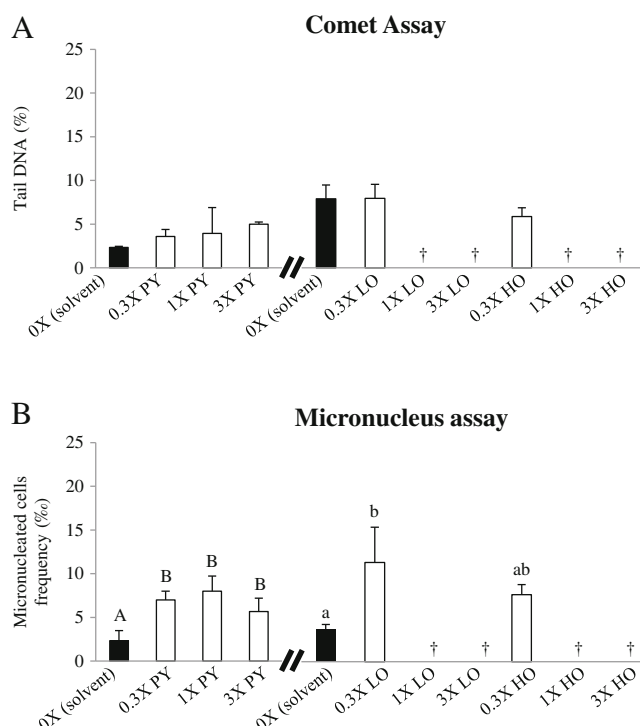


Fig. 2 The PAH fractions induced genotoxicity following medaka embryo exposure to PAH-spiked sediments. Comet and micronucleus assays were performed on the same sample of cells obtained from the whole body of ten larvae. The different letters stand for significant differences between treatments (mean±SD, $N=3$, Anova, $p<0.05$)

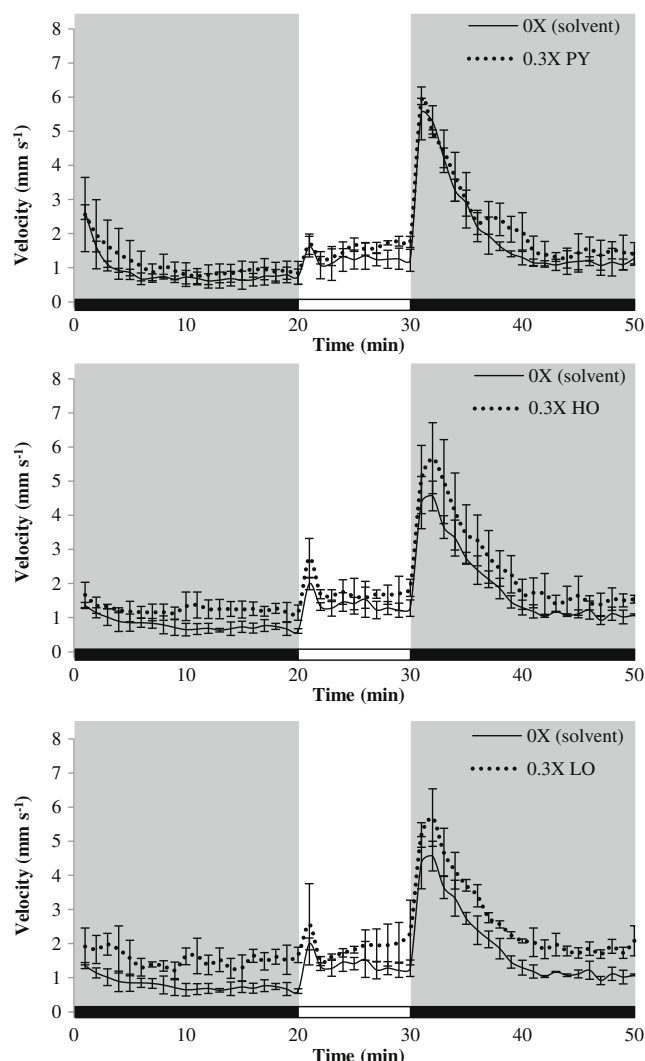


Fig. 3 Medaka larvae velocity during a 50-min video tracked analysis: 20 min dark+10 min light+20 min dark for 0.3× treated individuals. Embryos were exposed to PAH-spiked sediments. Data was averaged over each 1-min interval. (Mean±SD, $N=3$)

One aim of this work was also to compare the sensitivity of two model species for the same three PAH fractions (PY, LO, and HO) at 0.3× concentration (Table 4). The toxicity of these three fractions was initially tested on rainbow trout ELS (Le Bihan et al. [this issue](#), *in revision*), then tested on Japanese medaka (this study). PAH fractions and operators were identical, but comparison was limited by differences in exposure matrix, PAH-spiked concentrations, time of exposure, rearing temperature, photoperiod, water renewal, and salinity. This is relevant because it has been proved that certain light radiations enhance PAH toxicity, temperature increases dissolution of the compound, and salinity seems to raise PAH sorption (Barron et al. 2003; Turner and Rawling 2001; Faksness et al. 2008). Despite these differences, the PY fraction appeared to be the less toxic fraction for the two species. The two petrogenic fractions LO and HO fractions were shown to

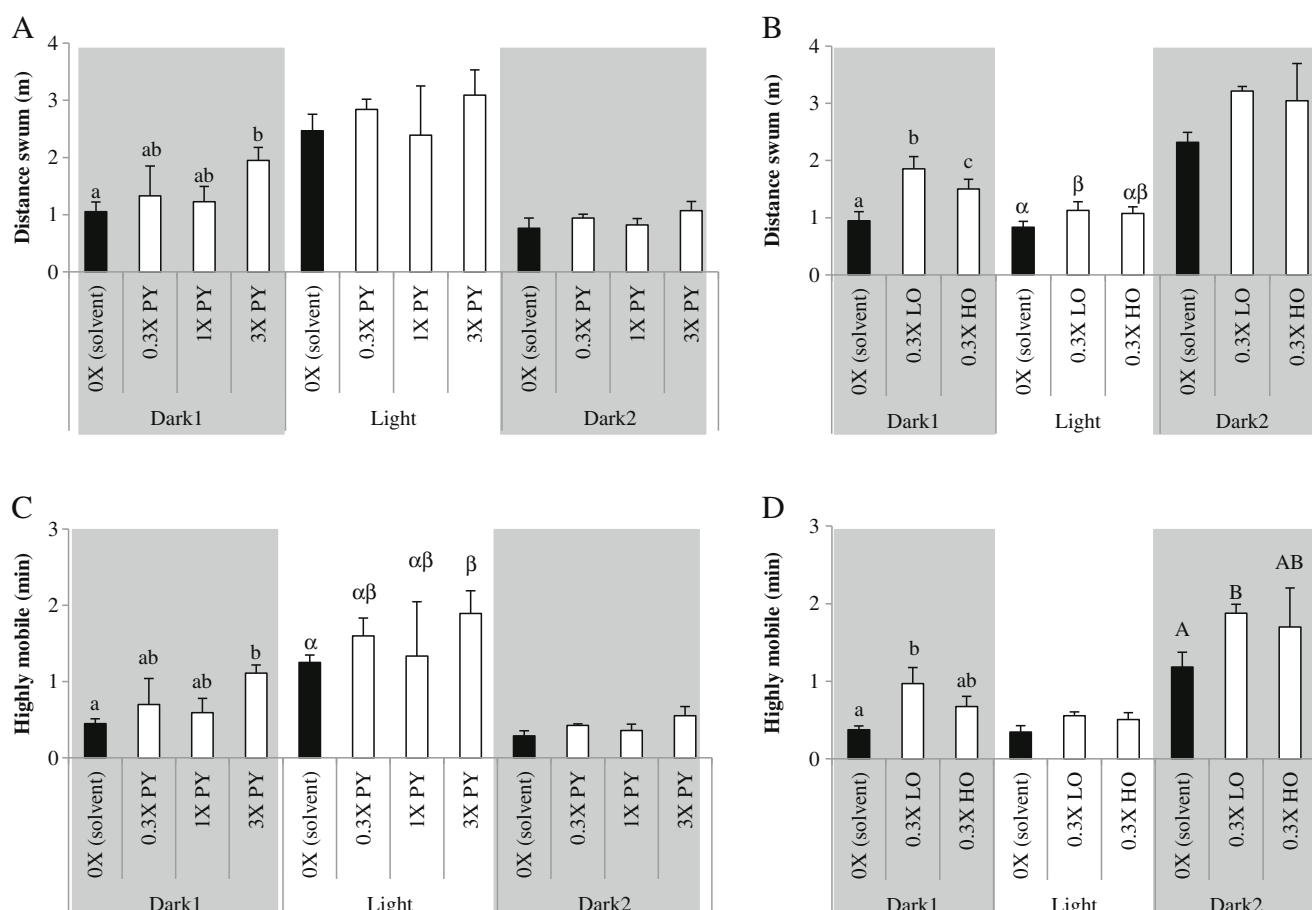


Fig. 4 The PAH fractions disrupted medaka larvae locomotion. Data was averaged out across each dark or light interval. Embryos were exposed to PAH-spiked sediment. The different letters stand for significant differences between treatments (mean±SD, $N=3$, Anova, $p<0.05$)

induce the majority of the effects on fish embryos and larvae. The PY fraction was mainly composed of 4–5 rings non-alkylated PAHs in opposition with the two petrogenic fractions, mainly composed of alkylated PAHs known to drive the developmental toxicity of PAH mixtures (Sundberg et al. 2005; Fallahtafti et al. 2012; Incardona et al. 2005). Several studies documented alkylated PAHs as more toxic than their non-alkylated homologs (Barron et al. 2004a; Turcotte et al. 2011). Exposure to PAH fractions impacted biometry, morphology, and DNA integrity of both species. On one hand, medaka larvae exhibited DNA damage detected with the MN assay, which are chromosomal aberrations caused by

clastogenic and aneugenic events. On the other hand, trout larvae presented only labile damages detected with the comet assay, such as single/double DNA strand breaks, alkali labile sites, and excision/repair DNA breaks. Medaka individuals develop faster than trout, meaning that their cells present a higher mitotic index. We can therefore hypothesize that DNA damage set quicker with medaka than it did with trout.

Several previous studies have compared toxicity responses exhibited by Japanese medaka and rainbow trout. On one hand, relationship was identified between both species (Belanger et al. 2013), and on the other hand, sensitivity was shown to vary between compounds. For endocrine disruptors, trout was more sensitive than medaka (Dobbins et al. 2008), while medaka appeared to be the more sensitive of the two when exposed to pulp and paper mill effluents (Orrego et al. 2011). When considering the three PAH fractions tested, rainbow trout ELS were significantly more sensitive to HO fraction than to LO, but this was not statistically evident for Japanese medaka. The main difference between these two petrogenic fractions is their proportion in alkylated naphthalene higher for LO and alkylated phenanthrene higher for HO. Our study showed similar toxicity gradients for PAH mixtures

Table 3 Toxic equivalencies (TEQ) calculated for the three PAH fractions according to BaP or dioxin

PAH fraction	TEQ/BaP ^a	TEQ/dioxin ^b
PY	13.3	0.032
LO	0.8	0.002
HO	7.5	0.009

^a(INERIS 2003) ^b(Barron et al. 2004b)

Table 4 Comparative toxicity of the three PAH fractions between rainbow trout and Japanese medaka. Values refer to the lowest PAH sediment concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw) causing a significant effect to the fish ELS

(LOEC). PAH concentrations include the sum of 21 non-substituted PAHs, methyl naphthalenic and methyl phenanthrenic compounds

	Rainbow trout (Le Bihanic et al. <i>submitted-a</i>)			Japanese medaka (This study)		
Parameters						
Concentrations tested	0.3× and 1×			0.3×, 1× and 3×		
Exposure matrix	Gravel			Artificial sediment		
Time of exposure	From eyed stage until hatching			From fecundation until hatching		
Temperature	10 °C			26 °C		
Photoperiod	Full dark			12:12		
Water renewal	No renewal			Daily renewal		
Salinity	0 PSU			5 PSU		
LOEC ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)	PY	LO	HO	PY	LO	HO
Survival	–	–	–	–	–	–
Hatching success	–	–	4.8 (1×)	–	3.6 (1×)	4.0 (1×)
Larvae total length	–	0.7 (0.3×)	1.3 (0.3×)	11.8 (3×)	0.5 (0.3×)	0.7 (0.3×)
Abnormal larvae	4.2 (1×)	0.7 (0.3×)	1.3 (0.3×)	11.8 (3×)	0.5 (0.3×)	–
Comet assay	–	4.1 (1×)	1.3 (0.3×)	–	–	–
Micronucleus assay	–	–	–	0.8 (0.3×)	0.5 (0.3×)	–

between medaka and trout ELS but slight differences in toxic potency. Compared to studies performed on single model species, multi-species studies offer a more comprehensive and accurate risk assessment of chemicals. Further supplementary experiments using similar exposure conditions for both species would strengthen these results.

TEQ calculations were not consistent with the toxicity observed in fish ELS (Table 3). The PY fraction is considered the most potent toxic fraction for both methods of TEQ calculation, while it was the least toxic from the point of view of acute and sublethal toxicity on Japanese medaka and rainbow trout ELS. TEQ values depend on the mode of action considered: carcinogenicity or AhR agonist (Barron et al. 2004b; INERIS 2003). However, these methods do not consider other modes of action such as nonspecific toxicity or toxicity independent of the binding to AhR. Moreover, PAHs are different in terms of structure and bioaccumulation to dioxin (Billiard et al. 2008). In order to take into account PAH developmental toxicity on fish ELS, other TEF values are needed. Considering complex mixtures of PAHs, the toxic potency is a function of the components and their interactions. The TEQ approach to PAH mixture assessment is oversimplified because it is based on the hypothesis of potency additivity and does not consider possible synergistic or antagonistic interactions between molecules (Wassenberg and Di Giulio 2004; Wassenberg et al. 2005). The findings described in our study do not support the TEQ approach. We may therefore assume that TEQ methods with the existing TEF values are not suitable for the toxicity assessment of complex PAH mixtures to fish ELS.

Conclusion

Developmental toxicity, locomotion defects, and genotoxicity were all detected at PAH concentrations similar to those occurring in sediments from various European rivers and estuaries. Our results raise the question of the impact of PAH-contaminated sediments on survival and recruitment in fish ELS. The toxic equivalency approach was not suitable for predicting the developmental toxicity of PAHs mixtures. The range of induced toxicity differed between fractions tested. The LO and the HO petrogenic fractions, with high proportions in alkylated and low to medium molecular weight PAHs, were more toxic to Japanese medaka ELS than the PY fraction. This was consistent with a previous study carried out on rainbow trout ELS.

Acknowledgments This study was funded by the French National Agency for Research's "Contaminant, Ecosystème et santé" program, as part of the ConPhyPoP (2009–002) research project. It was also included in the LABEX COTE cluster of excellence for continental and coastal ecosystems. Following the project, Florane Le Bihanic received PhD fellowship from "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The authors wish to thank CEDRE for providing oils, as well as Laure Landi for laboratory management.

References

- Barron MG (2002) Environmental contaminants altering behaviour. In: Dell'Omo G (ed) Behavioural ecotoxicology. Wiley, Chichester

- Barron MG, Carls MG, Short JW, Rice SD (2003) Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to pacific herring eggs and larvae. *Environ Toxicol Chem* 22(3):650–660
- Barron MG, Carls MG, Heintz R, Rice SD (2004a) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol Sci* 78(1):60–67
- Barron MG, Heintz R, Rice SD (2004b) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res* 58(2–5):95–100
- Baršienė J, Dedonytė V, Rybakovas A, Andreikėnaitė L, Andersen OK (2006) Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat Toxicol* 78(Supplement (0)):S99–S104
- Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ (2013) Use of fish embryo toxicity for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem* 32(8):1768–1783
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 105(1):5–23
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257–267
- Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environ Sci Technol* 41(22):7830–7836
- Carls MG, Thedinga JF (2010) Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Mar Environ Res* 69(5):318–325
- Carls MG, Rice SD, Hose JE (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18(3):481–493
- Çavaş T, Ergene-Gözükar S (2005) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74(3):264–271
- Colavecchia MV, Backus S, Hodson PV, Parrott JL (2004) Toxicity of oil sands to early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 23(7):1709–1718
- Couillard CM (2002) A microscale test to measure petroleum oil toxicity to mummichog embryos. *Environ Toxicol* 17(3):195–202. doi:10.1002/tox.10049
- de Esch C, Sliker R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D (2012) Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicol Teratol* 34(6):545–553
- Dobbins LL, Brain RA, Brooks BW (2008) Comparison of the sensitivities of common *in vitro* and *in vivo* assays of estrogenic activity: application of chemical toxicity distributions. *Environ Toxicol Chem* 27(12):2608–2616
- EC (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, and Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). vol L 396. Official Journal of the European Union at www.reach-compliance.eu/english/legislation/docs/launchers/launch-2006-1907-EC-06.html
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Leonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97(2):79–87
- Emran F, Rihel J, Dowling JE (2008) A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensities. *J Vis Exp* 20:e923. doi:10.3791/923
- Faksness L-G, Brandvik PJ, Sydnæs LK (2008) Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Mar Pollut Bull* 56(10):1746–1754
- Fallahtafai S, Rantanen T, Brown RS, Snieckus V, Hodson PV (2012) Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 106–107:56–64
- Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Míguez JM (2009) β -Naphthoflavone and benzo[a]pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf* 72(1):191–198
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinai N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 399(2):125–133
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Soils Sediments* 3(3):197–207. doi:10.1065/jss2003.09.085
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK, Scholz NL (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspect* 113(12):1755–1762
- Incardona JP, Day HL, Collier TK, Scholz NL (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(3):308–321
- INERIS (2003) Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérigènes: Approche substance par substance et approche par mélange - Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérigènes: valeurs toxiques de référence. Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte
- Irons TD, Kelly PE, Hunter DL, MacPhail RC, Padilla S (2013) Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 103(4):792–813
- Kim Y, Cooper KR (1999) Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 39(3):527–538
- Kiparissis Y, Akhtar P, Hodson PV, Brown RS (2003) Partition-controlled delivery of toxicants: a novel *in vivo* approach for embryo toxicity testing. *Environ Sci Technol* 37(10):2262–2266. doi:10.1021/es026154r
- Le Bihanic F, Perrichon P, Le Menach K, Budzinski H, Cousin X, Cachot J (2014) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environ Sci Pollut Res* this issue.
- Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Le Menach K, Budzinski H, Cachot J (in revision) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in Rainbow T. *Environ Sci Pollut Res* this issue
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical Ecology. Elsevier Science BV, Amsterdam
- Morin B, Filatreau J, Vicquelin L, Barjhoux I, Guinel S, Leray-Forget J, Cachot J (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal Bioanal Chem* 399(6):2235–2242. doi:10.1007/s00216-010-4602-y
- Nisbet ICT, LaGoy PK (1992) Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol* 16(3):290–300

- OECD (1992) Guidelines for the testing of chemicals fish early life stage toxicity test, Test No. 210. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development
- Orrego R, Guchardi J, Beyger L, Krause R, Holdway D (2011) Comparative embryotoxicity of pulp mill extracts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American flagfish (*Jordanella floridae*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 104(3–4):299–307
- Rhodes S, Farwell A, Mark Hewitt L, MacKinnon M, George Dixon D (2005) The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol Environ Saf* 60(3):247–258
- Rocha PS, Luvizotto GL, Kosmehl T, Böttcher M, Storch V, Braunbeck T, Hollert H (2009) Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *in vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 72(7):1842–1848
- Safe S (1993) Development of bioassays and approaches for the risk assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Environ Health Perspect Suppl* 101(3):317–325
- Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, Schumacher A, Selderslaghs I, Weiss C, Witters H, Braunbeck T (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33(2):128–132
- Sundberg H, Ishaq R, Akerman G, Tjamlund U, Zebuhr Y, Linderöth M, Broman D, Balk L (2005) A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. *Toxicol Sci* 84(1):63–72. doi:10.1093/toxsci/kfi067
- Turcotte D, Akhtar P, Bowerman M, Kiparissis Y, Brown S, Hodson PV (2011) Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. *Environ Toxicol Chem* 30(2):487–495
- Turner A, Rawling MC (2001) The influence of salting out on the sorption of neutral organic compounds in estuaries. *Water Res* 35(18):4379–4389
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 93(2):223–241
- Vicquelin L, Ji L-F, Peluhet L, Le Menach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat Toxicol* 105(3–4):235–245
- Vignet C, Bégout ML, Péan S, Lyphout L, Leguay D, Cousin X (2013) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* 10(3):365–375
- Wassenberg DM, Di Giulio RT (2004) Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ Health Perspect* 112:1658–1664
- Wassenberg DM, Nerlinger AL, Battle LP, Giulio RTD (2005) Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon heterocycles, carbazole and dibenzothiophene, on *in vivo* and *in vitro* cypla activity and polycyclic aromatic hydrocarbon-derived embryonic deformities. *Environ Toxicol Chem* 24:2526–2532

ARTICLE VI

Référence

Le Bihanic F, Le Menach K, Daffe G, Budzinski H, Gonzalez P, Cousin X, Cachot : Gene transcription levels versus PAH bioavailability and bioaccumulation in Japanese medaka early life stages exposed to PAH-spiked sediments. *En preparation*

Gene transcription levels versus PAH bioavailability and bioaccumulation in Japanese medaka early life stages exposed to PAH-spiked sediments

Florane Le Bihanic^a, Patrice Gonzalez^a, Guillemine Daffe^a, Karyn Le Menach^a, Hélène Budzinski^a, Xavier Cousin^{bc}, Jérôme Cachot^{a*}

^a *University of Bordeaux, EPOC, UMR CNRS 5805, avenue des facultés, 33405 Talence, France*

^b IFREMER, Ecotoxicology laboratory, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

^cINRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Abstract

The impact of PAHs on the early life stages of Japanese medaka fish was studied specifically in terms of bioavailability, bioaccumulation and effects on gene transcription. Embryos were incubated on artificial sediment spiked with three different PAH fractions: one pyrolytic fraction from contaminated sediment, and two petrogenic fractions from light and heavy crude oils. Total PAH concentrations, including non-methylated and methylated PAHs, were measured in sediment and water at day 0, 6, and 10, as well as in embryonic tissues. Fifteen target genes involved in antioxidant defenses, DNA repair mechanisms, apoptosis, mitochondrial metabolism, hormone synthesis, and embryonic development were investigated using quantitative real-time RT-qPCR in 6 dpf embryos and newly hatched larvae. The water was renewed daily. Total PAH concentrations in water and sediment decreased throughout exposure. PAH concentration ratios remained the same in the sediment, water, and embryos when compared with the initial fractions. Bioaccumulation of PAHs was detected in embryos exposed to the heavy oil fraction. PAH concentrations in water and embryo tissue were positively correlated to *cyp1A* transcription levels. Significant gene transcription modulation was observed for several genes involved in cell cycle control, DNA repair (*p53*), vitamin A (*rara1*) and estrogen (*cyp19b*) metabolism, respiratory chain functioning (*cox1*) and antioxidant defenses (*sod Cu*). These changes in gene expression provide elements to better understand mechanisms of PAH mixture toxicity in fish early life stages.

Keywords: fish embryos, spiked sediment, PAH mixtures, embryotoxicity, gene expression, RT-qPCR

Abbreviations: PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; dpf: days post fertilization; ERS: Egg Rearing Solution; MELAc: Medaka Embryo-Larval Assay with sediment contact exposure; dw: dry weight; AhR: aryl hydrocarbon receptor; PY: pyrolytic; LO: Light oil; HO: heavy oil;

*Corresponding author: J. Cachot, UMR 5805 EPOC, University of Bordeaux, 351 cours de la liberation, 33405 Talence Cedex, France. j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr

Research highlights

- Embryos were exposed by direct contact to PAH-spiked sediments
- PAH proportions in sediment and water remained the same throughout exposure
- PAH bioaccumulation and expression of 15 selected genes were investigated
- *Cyp1A* transcript level was correlated to PAH concentrations in sediment, water and embryos
- Genes involved in vitamin A and estrogen metabolisms were modulated.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures found in aquatic environments are predominantly petrogenic and pyrolytic in nature. PAH mixtures from different origins have different PAH proportions and therefore different toxicity to aquatic organisms (Jung et al. 2013, Neff et al. 2000). In contaminated aquatic environments, PAHs are found predominantly in sediment, but also in particles, and occasionally dissolved in the water column (Cailleaud et al., 2007; Barbee et al., 2008; Depree, 2008). The processes affecting PAH sorption and desorption in sediment and particles significantly affect the concentrations available for uptake by organisms known as bioavailable fractions. Due to their hydrophobicity, PAHs can cross biological membranes and bioaccumulate in aquatic species (Baumard et al., 1999; Geffard et al., 2003). These compounds have also been detected in the lipophilic tissues of young fish (Hornung et al., 2007; Milinkovitch et al., 2011). The concentration of PAHs in these tissues is governed by the absorption and elimination kinetics, specific to each individual PAH and organism (Van der Oost et al., 2003; Mathew et al., 2008).

The medaka embryo-larval assay with artificial sediment contact exposure (MELAc) was selected in this study as an environmentally realistic scenario in which to evaluate the toxicity of PAH mixtures bound to sediment and particles (Le Bihanic et al. *in press-b*). A wide range of molecular markers were used. Cytochrome P450 1A1 (*cyp1A*) was studied as a biomarker of exposure to PAHs. *Wnt1* gene expression was analysed as a marker of embryo development (Fairbairn et al., 2012). The mitochondrial metabolism was considered via the Cytochrome C oxidase subunit 1 (*cox1*) and the quantity of mitochondria in the cells was estimated using mitochondrial 12s ribosomal RNA (Gonzalez et al., 2006). To evaluate antioxidant defenses both the mitochondrial (*sod Mt*) and the cytoplasmic copper/zinc (*sod Cu*) superoxide dismutases which catalyze the destruction of superoxide free-radicals were analysed (Gonzalez et al., 2006; Regoli and Giuliani, 2013). Because PAHs are known to be genotoxic, different DNA repair mechanisms were also considered: the base excision repair mechanism via the 8-Oxoguanin glycosylase (*ogg1*), the nucleotide excision repair via *rad 23* and cell-cycle arrest and DNA excision repair by *gadd45* and *p53* (Kienzler et al., 2013). The apoptosis mechanism was studied via *p53*, Bcl-2-associated X (*bax*), and *caspase 3* genes (Basu and Haldar, 1998; Oxendine et al., 2006). In fish, two cytochrome P450 aromatases exist (Callard et al., 2001). They are encoded by two genes, *cyp19a1* in the ovaries and *cyp19a2* (*cyp19b*) in the brain. *Cyp19b* plays a key role in regulating estrogen levels (Cheshenko et al., 2008), and was selected as a marker of estrogenic disruption. Because the vitamin A pathway has previously been shown to interact with other signaling pathways upon

exposure to pollutants (Rolland, 2000), the expression of *rara1* retinoic acid receptor was also investigated (Bilbao et al., 2010).

Three PAH mixtures were examined: a pyrolytic PAH fraction from contaminated sediment, and two petrogenic PAH fractions from a light oil (*Arabian Light*) and a heavy oil (*Erika*). Previous work reported acute toxicity from $4 \mu\text{g g}^{-1}$ for this light and heavy oil fractions (Le Bihanic et al., *in press-a*). On this basis, a lower concentration was used to investigate the possible effects of low PAH concentrations on genetic responses of fish early developmental stages. The three objectives of our study were to assess (1) the bioavailable fraction of PAHs from spiked sediments, (2) the profile and levels of PAHs bioaccumulated in tissues of exposed embryos and (3) the effects of PAH exposure on expression of 15 selected genes in medaka embryos and larvae.

Material and methods

PAH fraction samples

The pyrolytic PAH fraction (PY) was extracted from contaminated sediment in the Seine River, sampled in March 2010 in Oissel (Normandy, France). The CEDRE (Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution) provided both the *Arabian Light* crude oil (LO) and the *Erika* heavy oil (HO). The PAH fraction from the sediment sample was extracted using microwaves (Soxwave 100, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). The two oils were dissolved in pentane (Atlantic Labo, Bruges, France) to induce asphaltene precipitation. Both the sediment extract and the two pentane extracts were then concentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas city, USA) before purification with alumina columns (preparative liquid chromatography). Dichloromethane was used as an elution solvent. Samples were then concentrated again and eluted on silica columns. Aliphatic fractions were discarded with pentane, and aromatic fractions obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents. Finally, samples were concentrated, with the final fractions kept in dichloromethane (stored at -20°C) prior to the sediment spiking experiments. Each step in the process was gravimetrically controlled in order to prevent PAH losses and allow results to be expressed in terms of quantity of the original substance (ie sediment or oils).

Sediment spiking

Artificial sediment matrix was composed of 92.5 % silica sand, 5 % kaolin clay and 2.5 % dw blond peat (Le Bihanic et al. *in press-b*). Nominal total PAH concentration was set at $3 \mu\text{g g}^{-1}$ dw sediment. The sediment was spiked with dichloromethane as a solvent (Biosolve, Valkenswaard, the Netherlands) in a 1L glass balloon, using a rotary evaporator (Rotavapor, IKA, Staufen, Germany) (Vicquelin et al. 2011). Control sediment was spiked with dichloromethane only. Spiking efficiency calculations were based on the sum of PAH concentrations, amounting to 21 non substituted PAHs, methyl naphthalene and methyl phenanthrene compounds. Solvent was evaporated at 45°C , 115 rpm for approximately 3 h. The spiked sediment was kept in the dark, at room temperature prior to the assay.

Exposure

Gis-Amagen (INRA-CNRS laboratory, Jouy-en-Josas, France) provided Japanese medaka *Oryzias latipes* eggs at the gastrula stage. One day post fertilization (dpf) embryos were placed onto the spiked sediment surface throughout embryonic development. Control condition consisted in embryos reared on sediment spiked with solvent only. Exposure units were 55 mm diameter Petri dishes (Greiner, Courtaboeuf, France) with 10 g dw of spiked sediment, 8 mL of Egg Rearing Solution (ERS) and 68 embryos. Each treatment condition was replicated six times. The experiment took place in temperature-controlled chambers (Snijders Scientific, Tilburg, Netherlands) at 26 ± 0.3 °C with a photoperiod light:dark 12:12, 5000 lx white light. ERS was daily renewed. Throughout the experiment, dissolved oxygen was measured with a fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany) and pH with a HI 1083 probe (Hanna instruments, Rhode Island, USA). Oxygen and pH sensors were placed at the interface layer between water and sediment.

Sampling

For PAH concentration analysis, sediment was collected on three separate occasions: just after spiking at the time of 0 dpf (T0), at 6 dpf (T6), and 10 dpf (T10). ERS was collected in glass vials at T6 and T10 for the three replicates of each set of exposure conditions. Fifty embryos were collected at T6 from each replicate of exposure in Eppendorf® tubes. Sediment, water and embryos were stored at -20 °C prior to chemical analysis. Fifty larvae were collected stepwise hatching but because of PAH concentration in larvae tissues too closed from limit of detection, results were not presented in this article.

For gene expression analysis, 3 pools of 6 individuals were sampled from each replicate exposure, transferred in 300 µL of RNA later solution (Qiagen, Hilden, Germany), and then directly frozen in liquid nitrogen. For each condition, these 3 pools were analyzed separately and considered as three replicates of the same condition. Embryos were sampled in their chorion at T6 and larvae were sampled from T10 stepwise hatching. Embryos and larvae samples were stored at -80 °C prior to RT-qPCR analysis.

Sampling at T6 was performed within the first three replicates of the six and sampling at T10 within the three replicates left.

PAH concentration analysis

Wet sediment and tissues at T6 and T10 were freeze-dried before analysis. Internal deuterated standards naphthalene d8; dibenzo[*bd*]thiophene d8; phenanthrene d10; anthracene d10; fluoranthene d10; chrysene d12; benzo[*e*]pyrene d12; benzo[*a*]pyrene d12; and benzo[*ghi*]perylene d12 were added prior to extraction to 0.2 g of sediment or 0.01 g of embryo tissues and one blank analysis. PAH compounds were extracted for 10 min at 30 W using microwaves, with dichloromethane as solvent (Budzinski et al., 2000). Samples were then concentrated and purified using alumina micro-columns. The aliphatic fraction was eluted on silica micro-column using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents. Pyrene d12 and benzo[*b*]fluoranthene d12 were added to the samples as syringe standards before injection.

For water analysis, internal deuterated standards were added to 1.4 mL of medium including: naphthalene d8, acenaphthylene d8, acenaphthene d10, fluorene d10, phenanthrene d10, anthracene d10, fluoranthene d10, pyrene d10, benzo[*a*]anthracene d12, benzo[*b*]fluoranthene d12, benzo[*e*]pyrene d12, benzo[*a*]pyrene d12, perylene d12, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene d12, dibenzo[*ah*]anthracene d14, benzo[*ghi*]perylene d12, chrysene d12, phenanthrene d10, dibenzo[*b,d*]thiophene d8.

PAHs from sediment, water and tissue were analysed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (Baumard et al., 1999). Total PAH concentration referred to 21 parent compounds: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, dibenzo[*bd*]thiophene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[*a*]anthracene, triphenylene, chrysene, benzo[*b*]naphto[2,1-*d*]thiophene, benzo[*b+k+j*]fluoranthene, benzo[*e*]pyrene, benzo[*a*]pyrene, perylene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, dibenzo[*ah*]anthracene, dibenzo[*ac*]anthracene, benzo[*ghi*]perylene, as well as methyl compounds: 2-methylnaphthalene, 1-methylnaphthalene, 3-methylphenanthrene, 2-methylphenanthrene, 2-methylantracene, 9-methylphenanthrene + 2-methylantracene, 1-methylphenanthrene, 4-methyldibenzothiophene, 3+2-methyldibenzothiophene, 1-methyldibenzothiophene, dimethylnaphthalenes, trimethylnaphthalene, tetramethylnaphthalenes, dimethylphenanthrenes, trimethylphenanthrenes, and methylchrysenes.

Gene expression analysis

RNA extraction was then performed using an Absolutely RNA Mini-prep[®] kit (Stratagene, Agilent, USA) according to manufacturer's instructions. Japanese medaka embryos and larvae were homogenized using two different methods. Larva tissue was crushed with ceramic microspheres of 1.4 mm diameter (Lysing matrix D bulk, MP biomedical, Santa Ana, USA) using the homogenizer FastPrep[®]-24 (40s MP biomedical, Santa Ana, USA), 4 movements per sec at room temperature, while embryos were crushed manually with micro-tube pestles in order to break the chorion. The kit protocol included a DNAase treatment. The quality of RNA was evaluated using a 1 % agarose-formaldehyde gel electrophoresis, and their concentration was determined by spectrophotometry.

RNA retro-transcription was performed using the Affinity Script Multiple Temperature cDNA synthesis[®] kit (Stratagene, Agilent, USA) according to manufacturer's instructions. The cDNA obtained at the end of the reaction was stored at -20 °C until real-time PCR reaction.

Accession numbers of the 17 selected genes used in this study are reported in Table 1. For each specific gene, forward and reverse primer pairs were designed using the Light Cycler probe design v1.0 software (Roche, Meylan, France).

Real-time PCR reactions were performed in a Stratagene Mx3000P (Stratagene, Agilent, USA) using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix kit (Agilent) according to manufacturer's instructions. In each microplate well, 10 µL of 2X buffer (Promega, Fitchburg, USA), 7 µL of DEPC water, 2 µL of forward and reverse primer mix (1:1, v/v, 2 µM each) and 1 µL of cDNA were added. Real-time PCR reaction included a first step of activation during 10 min at 95 °C, then 35 to 50 amplification cycles consisting of 30 s at 95 °C, 40 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. The amplification and fusion curves of each sample were verified at the end of the reaction using the MxPro QPCR Software (Stratagene, Agilent, USA). The cycle threshold value (Ct) was then extracted. Gene expression of a sample was

calculated using the following formula: $2^{-\Delta Ct}$, where ΔCt is the difference between the Ct of the gene studied and the mean of the Ct of the two housekeeping genes *β-actin* and *rpl7* (Livak and Schmittgen, 2001; Zhang and Hu, 2007). The induction factor for a specific gene is the ratio of the mean transcription level of the treated individuals to the average transcription level of the solvent-treated individuals.

3.1

Table 1. Accession numbers and specific primer pairs of the 2 housekeeping genes and 15 target genes in Japanese medaka.

Gene	Accession number	Primer (5'- 3')
β-actin	S74868	GTGACCCACACAGTGCC ^a GCGACGTAGCACAGCTTC ^b
rpl7	NM_001104870	AACGTGGCTACGGCAG ^a CGAGGTGACGACAGCTT ^b
cyp1A	AY297923	CTCCCTTTCACAATTCCACACT ^a TGCAACGCCGCTTTCC ^b
wnt1	AJ243208	CCGCTTTGACGGAGCAT ^a TTGAACCCACGCCCACAGC ^b
β-catenin	XM_004077778	CCAACCTGACCTGCAACA ^a GCGACGGCGGATGAAGTA ^b
p53	AF212997	TCTGGCACTGCAAAGTCTGT ^a CCTCGTTTTGGTGGTGGG ^b
bax	ENSORLG00000000456	TCTTCGCTCAGTCCCTCC ^a GCCAACGTCTGCCAGCCA ^b
caspase 3	AB032608	TTGTCTTGTAAGGACACCGC ^a GCGATCAGGAGCAGGTGAA ^b
sod Mt	ENSORLG00000013261	ATGGCTGGGCTATGACAAAG ^a TGGCTATCTGAAGACGCTCAC ^b
sod Cu	ENSORLG00000008041	GGGAAATGTGACCGCAGG ^a GCCAAACGCGCTCCAG ^b
rarα1	EF546452	GCATCATCAAGACGGTGGAG ^a GGCGAAAGCGAAAACCAGG ^b
cyp19b	AY319970	CATTCTCAACATTGGTCTCATGC ^a CGGGGACACACCGTGTA ^b
gadd45	AB211172	GGAAGTGAACGGGGACTATTCT ^a CGTCCTTCACGTCGTCCTC ^b
ogg1	ENSORLG00000010758	CTCGTATTCAGGGCATGGT ^a ACCCGTGGCTGTCTAAG ^b
rad 23	ENSORLG00000005624	CAGCAGACCTTCAAAATCGACA ^a ACCATGACGACCACAAAGT ^b
coxI	NC_004387	TTCCCCCAACACTTCTTAGGC ^a TGTGGCTGTAGTTCGACTGA ^b
12s	AF257248	AGCCATTTCTTCCCCTCTCA ^a AGGGTACTACGAGCACCAG ^b

^aForward primer

^bReverse primer

Statistics

All conditions were replicated on three different Petri dish. Each Petri dish was treated as an independent sample. For gene expression, genes were considered as differentially expressed if both a 2-fold change in expression and a statistic significance were observed. Normality of the data distribution was tested using the F-test ($p < 0.05$). In case of normal distribution, the Student *t*-test was used for paired comparisons to control group ($p < 0.05$). If not, data were analysed with the Mann-Whitney U non parametric test ($p < 0.05$). Data with aggregated distribution were logarithmically transformed before statistical analysis (Legendre and Legendre, 1998). For other data sets, since the variance was uniform (Levene, $p < 0.05$) and the data normalized (Shapiro-Wilk, $p < 0.01$), one-way Anova analysis was performed followed by the Tukey post-hoc test ($p < 0.05$). Statistical analyses were calculated with Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Principal component analysis (2 axes) was performed with the R software (<http://cran.r-project.org/>) using the *ade4* package.

Results

During the sediment exposure, dissolved oxygen concentration was above 86 %, with an average pH of between 6.6 and 7.7 for all treatments, and survival in controls above 80 % (Table 2). These conditions ensured optimal development of medaka embryos, as recommended by the OCDE guidelines for fish embryo-larval assays (OECD, 1992).

Table 2. Acute toxicity of three different PAH mixtures on medaka embryos. Different letters refer to significant differences within treatments (Mean \pm SD, N = 3, Anova, $p < 0.05$).

	Solvent	PY	LO	HO
Dissolved O ₂ (%)	88.0 \pm 5.9	89.2 \pm 5.0	86.6 \pm 6.5	87.0 \pm 3.5
pH	7.6 \pm 0.1	7.9 \pm 0.1	7.6 \pm 0.1	7.7 \pm 0.1
Embryonic survival (%)	95.2 \pm 2.4	93.9 \pm 2.1	96.6 \pm 1.1	94.6 \pm 2.5
Hatching rate (%)	93.9 \pm 2.1 ^a	92.6 \pm 3.1 ^a	94.6 \pm 1.1 ^a	16.8 \pm 4.5 ^b

PAH concentration analysis

By using a wider range of PAH molecules, we were able to describe the mixtures in much greater detail than would have been possible with a traditional combination of only 16 non-substituted PAHs (as used by US-EPA). Sediment spiking recovery was 51 % for the PY fraction, 39 % for the HO fraction and only 9 % for the LO fraction (data not shown). PAH concentrations in the solvent control sediment were below 0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$ during the exposure (Fig. 1). PAH proportions differed between fractions. Taking into account overall PAH concentration, HO-spiked sediment presented the highest concentration of total PAH with 3.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ at T0, compared to 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the PY-spiked sediment, and to 0.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the LO-spiked sediment. The highest proportion of high molecular weight compounds of 4 to 6 cycles was detected for the PY fraction. HO-spiked sediment presented the highest proportion of 3-ring methylated PAHs (46 %), compared to 14 % for the LO sediment and 11 % for the PY

sediment. For the PY and the HO-spiked sediments, PAH concentrations were the highest at T0. Concentrations were stable between T6 and T10 for PY-spiked sediment and decreased between T6 and T10 for HO sediment. For LO sediment PAH concentrations at T0, T6, and T10 were comparable. PAH proportion of the studied fractions was maintained after spiking and along the exposure for the PY and HO, but to a lesser extent for the LO.

PAH concentration in water was below $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ for the solvent treatment (Fig. 2). Dissolved PAHs were found in the water column for the three fractions tested, and concentrations were higher at T6 than at T10. For HO exposure, $15.8 \mu\text{g L}^{-1}$ of PAHs was measured in average in water at T6 and $4.1 \mu\text{g L}^{-1}$ at T10. Dissolved HO PAHs included predominantly 2-ring methylated PAHs (60 % and 49 % at T6 and T10 respectively) and 3-ring methylated PAHs (26 % and 29 % at T6 and T10 respectively). For LO exposure, 0.4 and $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ of PAHs were measured in water at T6 and T10 respectively, 35 and 45 % of 2-ring methylated PAHs, and 9 and 4 % of 3-ring methylated PAHs. For PY exposure, 2.7 and $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ of PAHs were measured in water at T6 and T10 respectively, including 18 and 17 % of 3-ring methylated PAH and 19 % of 2- ring methylated PAHs.

PAH bioaccumulation

The total quantity of bioaccumulated PAHs was below $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ dw in embryos exposed to the control solvent, the PY, and the LO fractions (Fig. 3). In contrast, PAH tissue concentration reached $4.3 \mu\text{g g}^{-1}$ in embryos exposed to HO fraction, including 25 % of 3-ring methylated compounds, 52 % of 2-ring methylated compounds, and less than 0.3 % of heavy PAHs (5 and 6 aromatic ring). The total bioaccumulated PAHs in HO embryos was significantly higher than for the other treatments (Anova, Tukey, solvent: $p = 0.003$, PY: $p=0.005$, LO: $p = 0.001$).

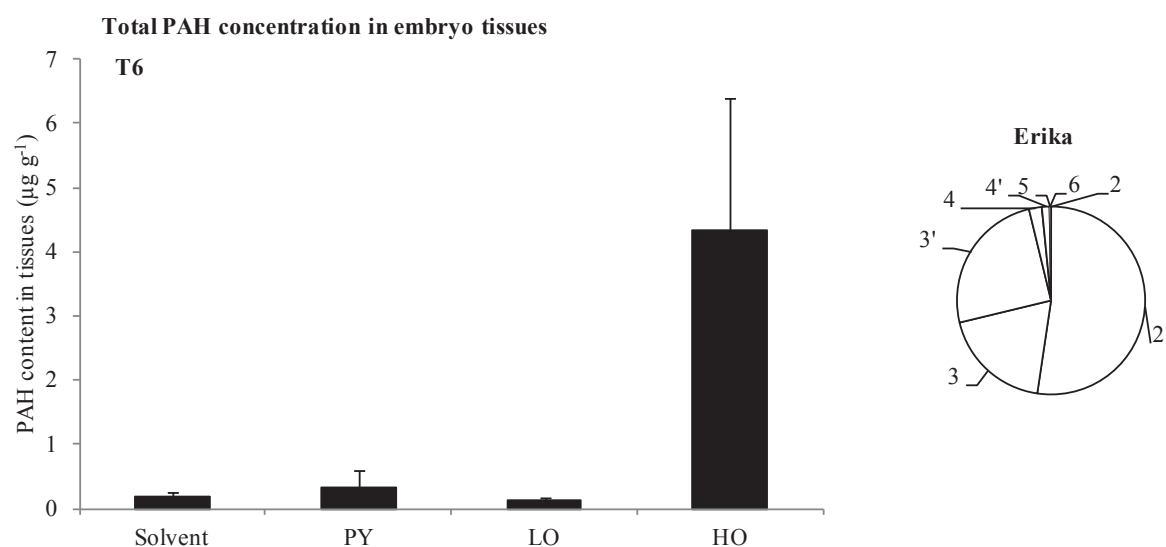


Figure 3. PAH concentrations in the whole body of medaka embryos at T6 (Mean \pm SD, N = 3).

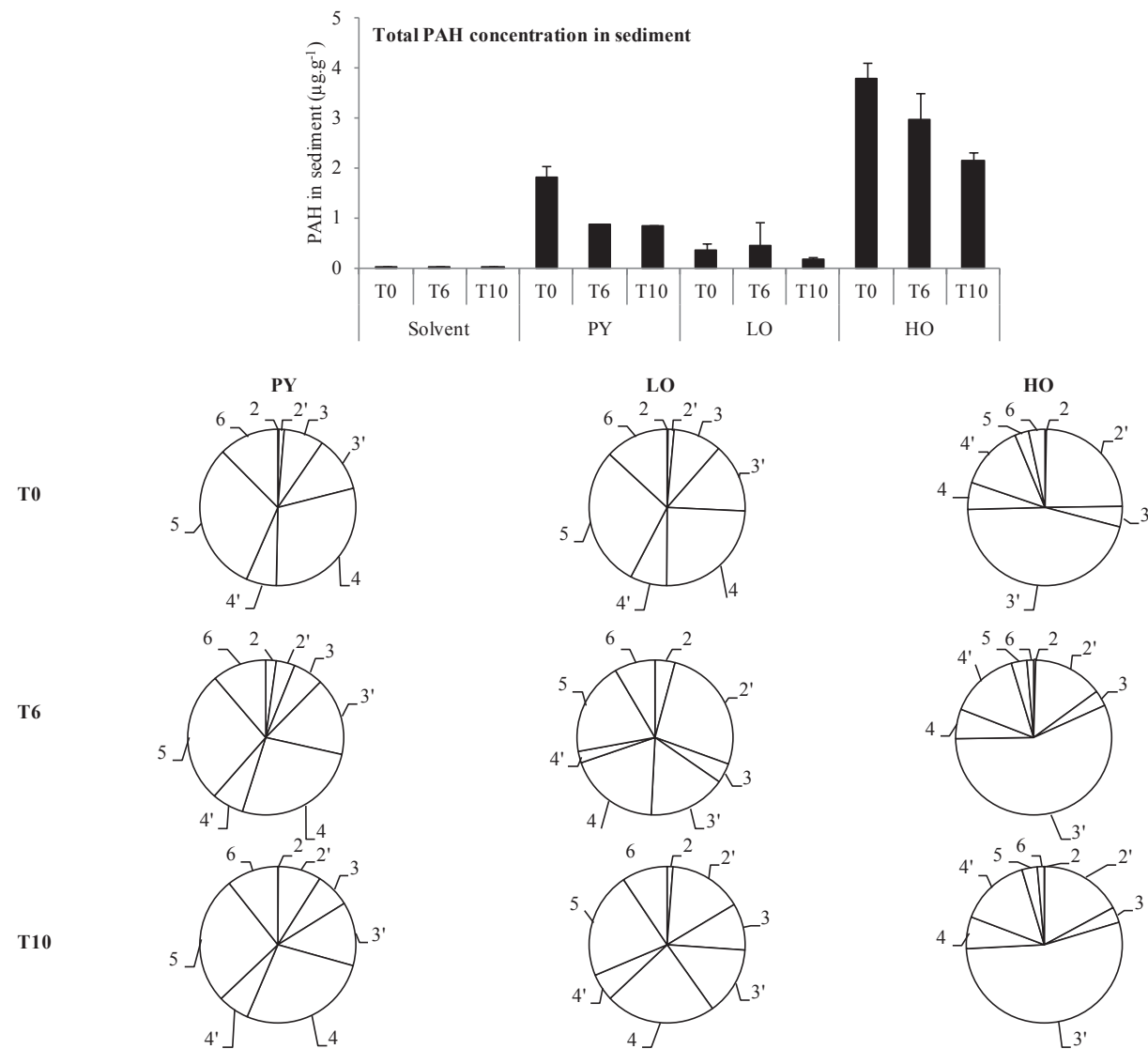


Figure 1. PAH concentrations in spiked-sediment. T0, T6 and T10 refer to sampling time at 0 dpf, 6 dpf and 10 dpf (Mean \pm SD, N = 3).

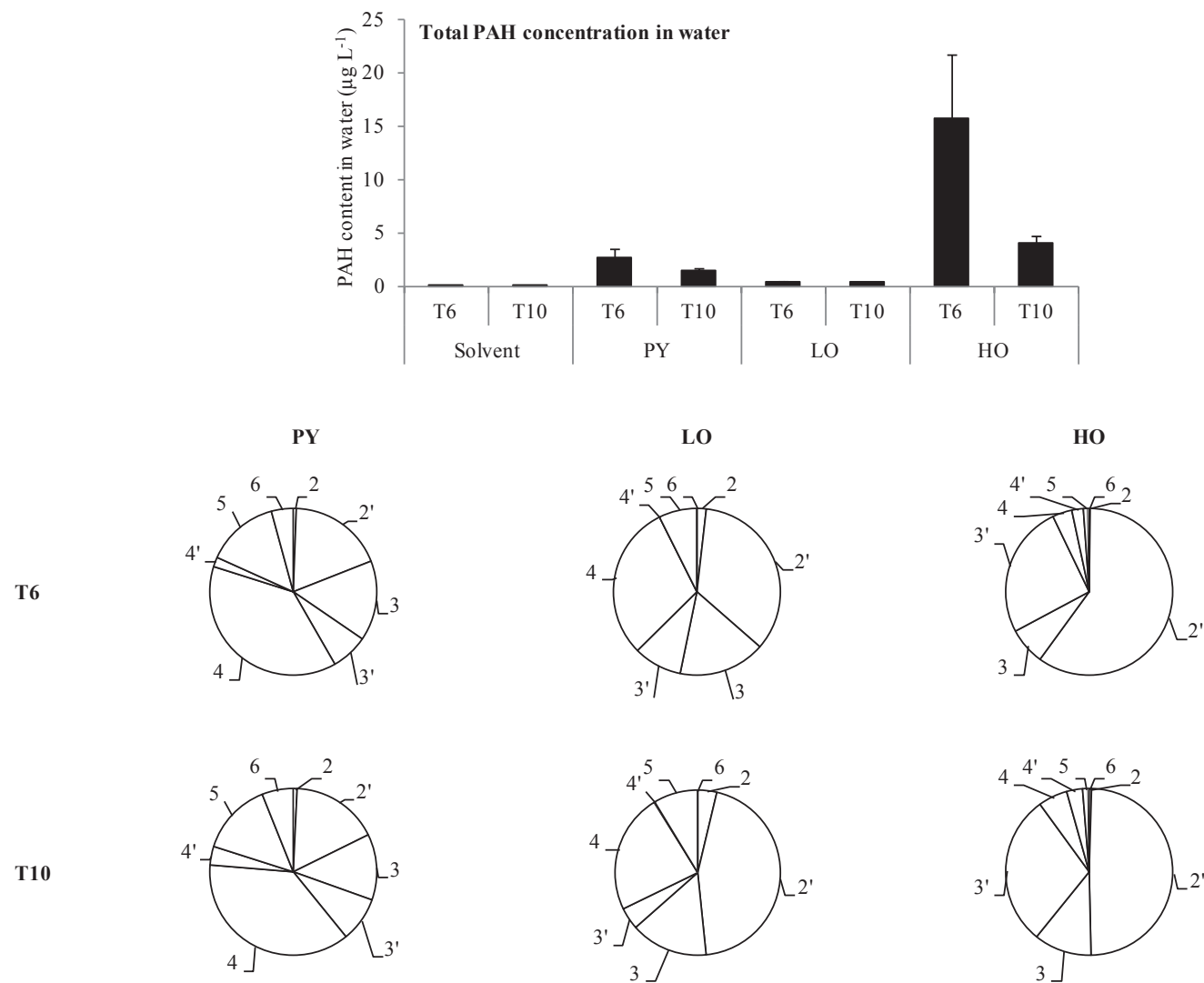


Figure 2. PAH concentrations in the water column of exposure units. T0, T6 and T10 refer to sampling time at 0 dpf, 6 dpf and 10 dpf (Mean \pm SD, N = 3).

Gene expression

Gene expression was monitored at both the embryonic and the larval stages, with the exception of HO-exposed larvae, due to a very low hatching rate for this treatment (17%, Table 2). There was no statistical change in expression of the two reference genes *β-actin* and *rpl7* regarding treatments. The *cyp1A* gene was significantly over expressed for all treatments at both developmental stages (Table 3). The highest *cyp1A* expression was recorded for embryos treated with HO with an induction factor roughly equivalent to 400. *Cyp1A* induction was 2.8 fold higher at larval stage than embryonic stage for LO exposure and 1.4 higher for PY exposure. There was no significant induction of the *wnt1* and *β-catenin* gene expressions. Exposure to PY and LO fractions significantly repressed *p53* gene expression at the embryonic stage. In contrast to *sod Mt* gene, *sod Cu* gene expression was modulated by PAH exposure. When treated with PY and LO fractions, a slight non-significant over-expression of the *sod Cu* gene was detected in embryos. The expression of the pro-apoptotic genes *bax* and *caspase 3* was not significantly regulated. Neither was that of *gadd45*, *ogg1* and *rad23* genes. *Rara1* expression was lower than in the control group for PAH-treated embryos, and this was significant for PY and LO treatments. The expression exhibited in *cyp19b* differed depending on the developmental stage. At the embryonic stage, *cyp19b* was slightly over-expressed for the PY treatment, while at the larval stage it was significantly repressed for LO. The ratio *coxI*/*12s* was 3.3 times higher at larval than embryonic stages, and there was no significant differences within treatments.

Table 3. Gene transcription levels in medaka at T6 (embryos) and T10 (larva) exposed to PAH mixtures. Data was expressed as induction (above 2) or repression (below 0.5) factors regarding to the solvent treatment. Slashes refer to no change in gene expression and asterisks to significant difference with the solvent treatment (N=3, Student t-test or Mann-Whitney test, $p < 0.05$). Ratio *coxI/12s* was expressed as mean \pm SD (N = 3, Anova, $p < 0.5$). The majority of individual exposed to HO did not hatch, thus there was no analysis at T10.

Function	Gene	T6				T10		
		Solvent	PY	LO	HO	Solvent	PY	LO
Metabolisation	<i>cyp1A</i>		42.9*	7.4*	398.7*		58.8*	20.8*
Development	<i>wnt1</i>		/	/	/		/	/
	β -							
Cytoskeleton	<i>catenin</i>		/	/	/		/	/
Apoptosis/ cell growth/ DNA								
repair	<i>p53</i>		0.3*	0.4*	/		/	/
Apoptosis	<i>bax</i>		/	/	/		/	/
	<i>caspase</i>							
Apoptosis	<i>3</i>		/	/	/		/	/
Anti-oxidative defense	<i>sod Mt</i>		/	/	/		/	/
Anti-oxidative defense	<i>sod Cu</i>		5.9	4.0	/		/	/
Vitamin A	<i>rara1</i>		0.3*	0.4*	0.4		/	/
Estrogen synthesis	<i>cyp19b</i>		2.3	/	/		/	0.2*
DNA repair	<i>gadd45</i>		/	/	/		/	/
DNA repair	<i>oggl</i>		/	/	/		/	/
DNA repair	<i>rad 23</i>		/	/	/		/	/
Mitochondrial metabolism	<i>coxI</i>		2.6	/	/		/	/
Mitochondrial ribosomal RNA	<i>12s</i>		2.1	/	/		/	/
		0.04 \pm 0.	0.05 \pm 0.	0.04 \pm 0.	0.04 \pm 0.	0.14 \pm 0.	0.12 \pm 0.	0.13 \pm 0.
	Ratio <i>coxI/12s</i>	01	02	03	02	04	05	05

Principal Component Analysis

PCA featured 81.5 % of the selected variables for the first two axes (Fig. 4A). Along the first axis (43.8 %), *12s* and *coxI* gene expressions were positively correlated to *cyp19b*, and *sod Cu*. These four genes were negatively correlated to *raraI* and *p53* genes. Furthermore, with high normalized coefficients along axis 2 (37.7 %), *cyp1A* gene expression was clearly positively correlated to total PAH concentrations measured in sediment, water and tissues at T6, but not correlated to the other gene expressions. This feature was particularly prominent for the HO condition (Fig. 4B). Solvent and HO groups were plotted distinctly while LO and PY groups segregated together on axis 1.

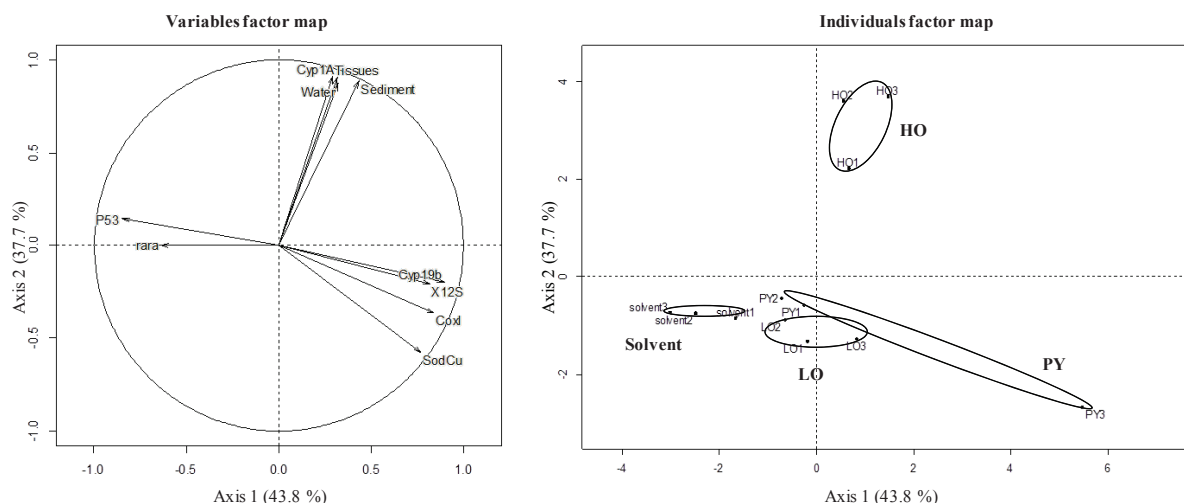


Figure 4. Principal component analysis of gene expression and total PAH concentration at T6. Analysis represents normalized coefficients on the first two axes analysis (axis 1: 43.8 %; axis 2: 37.7 %) for seven gene expressions in embryos (*rara* : *raraI*, *p53*, *cyp1A*, *cyp19b*, *X12s*: *12s*; *coxI*, *sod Cu*) and total PAH concentration in embryos tissues, sediments and water.

Discussion

Bioavailability

The bioavailability of PAHs is controlled by the sorption and desorption processes of the compound (Bittner et al., 2011). Organic matter — an effective sorbent for PAH molecules — is one of the main factors driving PAH embryo-larval toxicity (Guasch et al., 2012; Le Bihanic et al., *in press-b*). Dissolved organic matter plays a dual role in PAH bioavailability. On one hand, dissolved and particulate organic matter reduces the dissolved PAH concentration by trapping the PAH molecules (Fanget et al., 2002; Akkanen et al., 2012). On the other hand, authors have demonstrated that the presence of dissolved organic matter enhances the transport of PAHs by changing their water solubility (Mayer et al., 2007; ter Laak et al., 2009).

Farwell et al. (2006) reported petrogenic PAHs in concentrations of up to $88 \mu\text{g L}^{-1}$ having no effect on the hatching success of Japanese medaka, with a mortality LOEC of $44 \mu\text{g L}^{-1}$. Rhodes et al. (2005) reported a LOEC for hatching success of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ for a mixture of alkylated PAHs, and $200 \mu\text{g L}^{-1}$ for a mixture of non-alkylated PAHs. In the present study, exposure to HO fractions prevented hatching in Japanese medaka embryos up to a

concentration of $15.8 \mu\text{g L}^{-1}$, slightly lower than the aforementioned values. This result may be explained by the two different routes of exposure for embryos reared in direct contact to contaminated sediments, namely via the water column for dissolved PAHs, and via direct contact with the sediment for particle-bound PAHs. LO sediment presented lower concentrations of molecularly-light PAHs (2-3 rings) than expected, which could be explained by a loss of small molecules during extraction and spiking processes. Nevertheless, PAH proportions measured in water reflected sediment composition. PAH proportions were conserved for all fractions, with predominance of 3 ring PAHs for HO treatments. The exposure scenario using spiked sediments is thus an effective means of delivering environmentally realistic doses of hydrophobic pollutants such as PAHs (McElroy et al., 2006).

Bioaccumulation

The quantity of tissue available for PAH measurement was very small and the concentrations found in embryo tissue were close to the limit of quantification. They must therefore be interpreted with a degree of caution. Embryonic contamination by PAHs is a passive process controlled by the lipid solubility of the chemical (Helmstetter and Alden, 1995). The extent to which an organic compound can permeate the cell membrane generally increases with the partition coefficient $\log K_{ow}$, and this was observed during the early life stages of Japanese medaka (Mathew et al., 2008). However, PAHs detected in Japanese medaka embryos exposed to HO were mainly low molecular weight compounds. These results are consistent with those of Geffard et al. (2003), Baumard et al. (1999) and Brannon et al. (2012) who found higher bioaccumulation of low (rather than heavy) molecular weight PAHs in bivalves and fish. This apparent contradiction can be explained by the low bioavailability of high molecular weight PAHs, such as 4 to 6 rings, which is limited by their solubility. Moreover, PAH metabolism could also have decreased parent compound concentrations in tissues of medaka embryos.

Gene expression

In this study, the expression level of *cyp1A* gene was significantly over expressed compared to solvent control group for all fractions tested at embryonic and larval stages. *cyp1A* gene expression was strongly correlated to PAH concentrations in sediment, water and tissues. This result confirms embryo contamination and suggests possible biotransformation of PAHs in during the initial stages of their development (McElroy et al., 2006; Hornung et al., 2007). *Cyp1A* expression is a sensitive biomarker of PAH exposure, and can also be correlated to short time effects. Carls et al. (2005) reported the induction of CYP1A protein as an early bioindicator of adverse effects cause by crude oil. PAHs can induce the *cyp1A* gene by binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), with their binding affinity varying between molecules (Barron et al., 2004). AhR activation by agonist molecules could lead to the induction of the CYP1A protein, partly explaining developmental abnormalities previously observed on medaka larvae (Le Bihanic et al., *in press-a*). The *wnt/β-catenin* pathway was also reported to contribute to axial developmental abnormalities in zebrafish and sea urchin embryos caused by PAHs (Pillai et al., 2003; Fairbairn et al., 2012). However, no alteration of *wnt1* or *β-catenin* gene expression level was noticed in this study.

Increased expression levels of cytoplasmic *sod Cu* raise the possibility that ROS is produced as a result of PAH exposure. No change was observed for *sod Mt*, suggesting that this ROS production is probably limited to the cytoplasm, and consequently did not concern mitochondria. Furthermore, induction of *coxI* transcription might suggest an alteration of mitochondrial metabolism, and could also denote an increasing energy demand of the cell in response to contamination (Villani and Attardi, 2000; Achard-Joris et al., 2006). In addition, the joint increase (positively correlated) in *coxI* and *l2s* transcription levels following PAH exposure could indicate that the number of mitochondria increased to maintain the level of ATP production, particularly during exposure at the embryonic stage. Significant alteration of the *p53* gene transcription at the embryonic stage was also highlighted. Modulation of the *p53* gene may have multiple consequences on cell proliferation and differentiation, cell homeostasis, and DNA integrity (Basu and Halder, 1998). Regarding *bax* and *caspase 3* transcription levels, apoptosis did not seem to be triggered. In a previous study, exposure to the same PAH mixtures resulted in DNA damage induction in newly-hatched medaka larvae (Le Bihan et al., *in press-a*), but the steady-state expression level of *gadd45*, *ogg1*, and *rad23* did not confirm the activation of DNA repair mechanisms.

The *rara1* retinoic acid receptor was repressed in embryos exposed to all PAH fractions, and this was significant for the PY and LO fractions. Since retinoid acid is involved in the morphogenesis of the central nervous system (Alsop et al., 2007), *rara1* modulation may explain significant recorded changes in larvae locomotion after PY and LO exposure (Le Bihan et al., *in press-a*). Modulation of the *rara1* gene may also be associated with PAH ability to bind AhR as reported by Arcand-Hoy and Metcalfe (1999).

Modulation of *cyp19b* expression may point to PAH disrupting endocrine activity. Indeed, in our study, the PY fraction stimulated *cyp19b* expression at the embryonic stage, while the LO fraction inhibited transcription of this same gene at the larval stage. Those effects could be mediated by estrogen receptors, retinoic acid receptors, and AhR, as reported by Cheshenko et al. (2008). Bilbao et al. (2010) have also shown that retinoic receptors *RXR*, *cyp19b* (CYP19a2) as well as estrogen receptor α transcription levels were altered in juvenile grey mullet specimens exposed to Prestige oil. The results of this study suggested that exposure to PAHs also modulated expression of *rara1*, and *cyp19b* at the embryonic stage. Contrasting estrogenic activity of PAHs recorded at the embryonic and larval stages could be explained by changes in *cyp19b* gene expression during embryogenesis. Aromatase B activity is involved in neuronal regeneration as well as neuro-protection (Cheshenko et al., 2008). In the early developmental stages of teleost fish, the neuronal cells of the optic tectum expressed *cyp19b*, and the decreased innervation of this tectum was related to changes in larvae locomotor activity (Callard et al., 2001; Tchoudakova et al., 2001; Cowden et al., 2012). Therefore, modulation of *cyp19b* expression as a marker of neuronal cells activity could explain changes in locomotion observed in newly hatched larvae exposed to PAH fractions (Le Bihan et al., *in press-a*). With high PAH concentrations in sediment and water, HO treatment appeared to efficiently induce *cyp19a* transcription. Apart from this gene, expression levels did not seem to be correlated to PAH concentrations in sediment and water. This lack of a relationship between exposure concentrations and gene transcription levels could be explained by both complex regulation of gene transcription and toxicity thresholds.

Conclusion

PAH fractions spiked onto artificial sediment were readily available, as indicated by their accumulation in Japanese medaka embryos, along with changes induced in the transcription of

certain genes. PAH concentrations in tissues of embryos were linked to PAH concentrations in sediment and water. They also depended on the metabolic activity of the embryos. Modulation of genes from various pathways in embryos and larvae highlight the wide multi-target toxicity of PAH mixtures. Pyrolytic and petrogenic mixtures modulated genes responsible for (among others) anti-oxidative stress responses, mitochondrial metabolism, estrogen metabolism, and retinoic acid pathways. These results clarify in part the different modes of action and molecular targets of PAH mixtures in fish early life stages, in particular their adverse effects on development and behaviour.

References

- Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.-P., 2006. Cytochrome *c* oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals* 19, 237-244.
- Akkanen, J., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K., 2012. On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 91-98.
- Alsop, D., Brown, S., Van Der Kraak, G., 2007. The effects of copper and benzo[*a*]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 82, 281-295.
- Arcand-Hoy, L., Metcalfe, C.D., 1999. Biomarkers of exposure of Brown Bullheads (*ameirus nebulosus*) to contaminants in the lower great lakes, north America. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 740-749.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.-D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C., 2008. *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 454-464.
- Basu, A., Haldar, S., 1998. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol. Human Reprod.* 4, 1099-1109.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47, 415-439.
- Bilbao, E., Raingeard, D., de Cerio, O.D., Ortiz-Zarragoitia, M., Ruiz, P., Izagirre, U., Orbea, A., Marigómez, I., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2010. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquat. Toxicol.* 98, 282-296.
- Bittner, M., Macikova, P., Giesy, J.P., Hilscherova, K., 2011. Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environ. Int.* 37, 960-964.

Brannon, E.L., Collins, K., Cronin, M.A., Moulton, L.L., Maki, A.L., Parker, K.R., 2012. Review of the *Exxon Valdez* oil spill effects on pink salmon in Prince William Sound, Alaska. *Rev. Fish. Sci.* 20, 20-60.

Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., Le Menach, K., Garrigues, P., 2000. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 165-171.

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H., 2007. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.

Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 305-314.

Carls, M.G., Heintz, R.A., Marty, G.D., Rice, S.D., 2005. Cytochrome P4501A induction in oil-exposed pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* embryos predicts reduced survival potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 301, 253-265.

Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31-62.

Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165-173.

Depree, C.A.M.A.R.C., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Auckland's aquatic environment : sources, concentrations and potential environmental risks. Auckland Regional Council, Auckland, N.Z.

Fairbairn, E.A., Bonthius, J., Cherr, G.N., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons and dibutyl phthalate disrupt dorsal-ventral axis determination via the *Wnt/β-catenin* signaling pathway in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 124-125, 188-196.

Fanget, B., Devos, O., Naffrechoux, E., 2002. Pyrene transfer from clay particles to water: the role of humic acid. *Rev. Sci. Eau* 15, 95-108.

Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D.G., 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 600-607.

Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481-490.

Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.-P., 2006. Comparative Effects of Direct Cadmium Contamination on Gene Expression in Gills, Liver, Skeletal Muscles and Brain of the Zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19, 225-235.

Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A., Akkanen, J., Slootweg, T., Mäenpää, K., Leppänen, M., Agbo, S., Gallampo, C., Kukkonen, J.K., 2012. Bioavailability of organic contaminants in freshwater environments. *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 25-53.

Helmstetter, M.F., Alden, R.W., 1995. Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Aquat. Toxicol.* 32, 1-13.

Hornung, M.W., Cook, P.M., Fitzsimmons, P.N., Kuehl, D.W., Nichols, J.W., 2007. Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Sci.* 100, 393-405.

Jung, J.-H., Hicken, C.E., Boyd, D., Anulacion, B.F., Carls, M.G., Shim, W.J., Incardona, J.P., 2013. Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere* 91, 1146-1155.

Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquat. Toxicol.* 134–135, 47-56.

Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Le Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., *in press-a*. Developmental toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. *Environ Sci Pollut Res*.

Le Bihanic, F., Perrichon, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., *in press-b*. Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environ Sci Pollut Res*.

Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier Science BV, Amsterdam.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods* 25, 402-408.

Mathew, R., McGrath, J.A., Di Toro, D.M., 2008. Modeling polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation and metabolism in time-variable early life-stage exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1515-1525.

Mayer, P., Fernqvist, M.M., Christensen, P.S., Karlson, U., Trapp, S., 2007. Enhanced Diffusion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Artificial and Natural Aqueous Solutions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6148-6155.

McElroy, A.E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L.V., Setlow, R., Winn, R., 2006. Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo[a]pyrene dosed sediments. *Mar. Environ. Res.* 62, S273-S277.

Milinkovitch, T., Kanan, R., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., 2011. Effects of dispersed oil exposure on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the mortality of juvenile *Liza ramada*. *Sci. Total Environ.* 409, 1643-1650.

Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., Stejskal, I., 2000. Effects of weathering on the toxicity of three offshore australian crude oils and a siesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1809-1821.

OECD, 1992. Guidelines for the testing of chemicals fish early life stage toxicity test, Test No. 210. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development, pp. 1-18.

Oxendine, S.L., Cowden, J., Hinton, D.E., Padilla, S., 2006. Vulnerable windows for developmental ethanol toxicity in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 80, 396-404.

Pillai, M.C., Vines, C.A., Wikramanayake, A.H., Cherr, G.N., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryos through a β -catenin dependent pathway. *Toxicology* 186, 93-108.

Regoli, F., Giuliani, M.E., 2013. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* In press.

Rhodes, S., Farwell, A., Mark Hewitt, L., MacKinnon, M., George Dixon, D., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 247-258.

Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *Journal of Wildlife Disease* 36, 615-635.

Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., Callard, G.V., 2001. Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 427-439.

ter Laak, T.L., ter Bekke, M.A., Hermens, J.L.M., 2009. Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7212-7217.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Villani, G., Attardi, G., 2000. *In vivo* control of respiration by cytochrome *c* oxidase in human cells. *Free Radical Biol. Med.* 29, 202-210.

Zhang, Z., Hu, J., 2007. Development and Validation of Endogenous Reference Genes for Expression Profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to Endocrine Disrupting Chemicals by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Toxicol. Sci.* 95, 356-368.

CHAPITRE IV
Discussion générale & Conclusion

Ce chapitre résume les résultats obtenus et discutés. La pertinence du travail est argumentée en proposant des perspectives au regard des méthodes développées et de l'évaluation de la toxicité des mélanges de HAP.

1 Synthèse des résultats et discussion

L'objectif de cette thèse était d'étudier les effets des HAP sur les SPD de poissons en proposant de nouvelles méthodes d'évaluation de la toxicité pour l'analyse de composés purs et en mélange. Les tests embryo-larvaires sur truite arc-en-ciel et médaka japonais ont été adaptés pour l'évaluation de la toxicité de composés hydrophobes tels que les HAP (Chapitre II). De nouvelles méthodes d'exposition et de nouveaux marqueurs de toxicité ont été avancés dans une démarche de standardisation des tests et d'accroissement de leur sensibilité. Puis ces méthodes développées ont été incluses aux bioessais existants et ont permis de réaliser une étude comparative de la toxicité de plusieurs mélanges complexes de HAP (Chapitre III). Cette étude a été effectuée conjointement sur les stades embryo-larvaires de truite arc-en-ciel et de médaka japonais.

1.1 Optimisation du test MELAc

L'ensemble des expériences a respecté les recommandations de l'OCDE pour les tests de toxicité sur stades précoces de poisson en terme de concentration d'oxygène dissous et de survie des témoins (OCDE 1992).

Au cours de ce projet de recherche, les variations de composition et de préparation des sédiments ont mis en évidence les limites de l'utilisation des sédiments naturels comme référence pour le test MELAc. Ces variations ont directement modifié la biodisponibilité des contaminants enrobés pour les embryons de médaka japonais. En effet, deux échantillons de sédiment prélevés au même site mais à des années différentes (2008 et 2010) ont induit des toxicités différentes pour des concentrations en HAP semblables. Cela s'expliquerait par une évolution au cours du temps de la composition du sédiment. En effet, la composition du sédiment gouverne la biodisponibilité des contaminants hydrophobes qui y sont adsorbés (Akkanen et al. 2012, Fanget et al. 2002). En outre, il s'est avéré que le broyage du sédiment naturel plutôt que le tamisage avant enrobage a augmenté la biodisponibilité des composés enrobés. En broyant le sédiment, la surface d'adsorption des particules serait augmentée ainsi que leur polarité. Pour ces raisons, dans une démarche de standardisation de l'exposition, il est apparu que l'utilisation d'une matrice artificielle de référence était pertinente.

Par conséquent, nous avons élaboré un sédiment artificiel de référence adéquat pour l'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes par le test MELAc (article n° 1). La mise au point du sédiment a concerné la granulométrie, la teneur en argile et la matière organique. Pour être satisfaisant, ce sédiment doit à la fois permettre le développement normal des embryons dans les conditions témoins et une biodisponibilité maximale des composés enrobés. L'ajout d'argile dans la composition de la matrice a amélioré l'adsorption des HAP sur la matrice d'exposition à l'enrobage, en accord avec les travaux de (Fanget et al. 2002). La disponibilité des HAP a ainsi été réduite pour les embryons de médaka. L'ajout de tourbe dans la composition de la matrice, a diminué l'adsorption des HAP à l'enrobage et leur biodisponibilité. L'argile présente dans la matrice pourrait avoir réduit les sites de sorption des HAP en se liant aux acides humiques (Fanget et al. 2002). La biodisponibilité des molécules de HAP adsorbées sur de la matière organique est régie par deux propriétés majeures:

- la sorption gouvernée par les acides humiques qui piègent les molécules hydrophobes et réduisent la fraction dissoute des HAP et leur bioaccumulation dans les organismes (Akkanen et al. 2012, Fanget et al. 2002, Haitzer et al. 1999, Laor et al. 1998),

- la facilitation du transport des molécules hydrophobes en présence de matière organique dissoute et du transfert à travers les membranes biologiques (Bittner et al. 2011, Mayer et al. 2007, ter Laak et al. 2009).

Sur la base des effets observés, la composition de ce sédiment a été fixée à 92,5 % de sable de granulométrie 0,2–0,5 mm, 5 % d'argile kaolinite, et 2,5 % de tourbe de Sphaigne. Le sédiment artificiel normalisé pour le test sur chironomes OCDE n°233 est composé de 5 % de tourbe, 20 % d'argile et 75 % de sable (OCDE 2010). Le sédiment développé pour le MELAc propose donc une concentration en argile plus faible, adaptée au développement d'embryons de poissons. Ce sédiment a été validé à l'aide de trois substances pures : le Fluo, le BaA, et le BaP. Le Fluo et le BaA ont induit de nombreux effets tératogènes, plus modérés pour le BaP. Ces résultats sont conformes aux résultats d'Incardona et al. (2005, 2004) sur l'embryotoxicité des HAP. L'embryotoxicité des HAP vis-à-vis du médaka japonais s'est révélée inversement proportionnelle au Koc du composé : Fluo > BaA > BaP.

La composition du sédiment artificiel a également été testée sur un autre poisson modèle, physiologiquement proche du médaka japonais et couramment utilisé pour les tests de toxicité : le poisson zèbre *Danio rerio* (article n° 2). Les tests de locomotion réalisés sur les deux espèces ont révélé une altération plus marquée du comportement des larves de médaka que des larves de poisson zèbre. Le BaP a augmenté la sensibilité des larves au test PMR. Le Fluo a, quant à lui, provoqué un effet léthargique chez les larves exposées. (Gonçalves et al. 2008) ont aussi rapporté des effets léthargiques des HAP sur le comportement de poissons juvéniles. Le poisson zèbre est un modèle largement utilisé en écotoxicologie. Cependant dans le cas de cette étude, il s'est révélé moins sensible que le médaka japonais pour une exposition identique par sédiment contact. Ceci peut s'expliquer par la durée de développement embryonnaire, et donc d'exposition, plus longue chez le médaka japonais (de 8 à 11 jours) que pour le poisson zèbre (2 jours) (Iwamatsu 2004, Kimmel et al. 1995).

Afin de compléter le panel d'indicateurs de toxicité pour les tests embryo-larvaires, deux nouveaux marqueurs ont été proposés : une quantification des micronoyaux sur larves entières et un test de locomotion, tous deux adaptés pour les larves de médaka japonais (article n° 3). Le test de MN est couramment utilisé pour évaluer la génotoxicité dans les cellules issues de cultures ou isolées d'organismes multicellulaires (Classidy et al. 2007, Liu et al. 2013). Ce test est alors limité par de faibles taux de renouvellement cellulaire. La méthode proposée sur larves entières bénéficie du taux de division élevé au niveau des tissus des SPD et intègre la réponse des organismes face aux attaques d'agents pro-génotoxiques. D'autre part, le test de locomotion PMR a révélé une augmentation importante de l'activité locomotrice des larves dans les secondes qui suivent l'extinction de la lumière. Cette réaction des larves de médaka était similaire à celle observée chez les larves de poisson zèbre (Cowden et al. 2012, MacPhail et al. 2009). L'ensemble de ces outils méthodologiques a été appliqué à l'évaluation de la toxicité d'un composé peu étudié, le BaA. Ce composé s'est révélé cardiotoxique et tératogène en accord avec une étude réalisée sur le poisson zèbre (Incardona et al. 2006). Il a également induit des effets génotoxiques et perturbé la locomotion des médaka japonais. De même le pyrène, un HAP de structure comparable au BaA, a été reconnu comme diminuant les capacités natatoires de poissons juvéniles (Oliveira et al. 2012). Cette étude a permis d'évaluer la LOEC de ce HAP à 0,92 µg.g⁻¹ p.s., une concentration retrouvée dans des sédiments contaminés de nombreux écosystèmes à travers le monde.

1.2 Toxicité comparée des trois mélanges de HAP

Les outils méthodologiques développés et validés sur les substances pures ont ensuite été appliqués à l'étude de trois mélanges de HAP : un extrait pyrolytique de sédiment de Seine, un extrait pétrogénique léger *Arabian Light*, et un extrait pétrogénique lourd *Erika*. La toxicité de ces trois mélanges complexes de HAP a été étudiée vis-à-vis des embryons et larves de truite arc-en-ciel (article n° 4). Les résultats observés recoupent ceux rapportés par plusieurs études exposant des SPD de truite arc-en-ciel à des sédiments contaminés (Karlsson et al. 2008, Sundberg et al. 2005). De même, le pétrole ANSCO a induit le syndrome du BSD chez les SPD de saumon, hareng, choquemort et poisson zèbre (Barron et al. 2003, Couillard 2002, Heintz et al. 1999, Hicken et al. 2011). Ces auteurs ont mis en évidence des œdèmes péri-cardiaques, des hémorragies, des déviations de la colonne vertébrale et une réduction de la croissance. La fraction *Erika*, avec une composition comparable au pétrole ANSO, a induit des anomalies du développement similaires sur les larves de truite à l'éclosion. La tératogénicité et la génotoxicité des mélanges étudiés à des concentrations environnementales semblent reliées à des fortes concentrations en composés tricycliques non substitués et tricycliques alkylés. Des travaux précédents ont démontré une toxicité plus importante des composés tricycliques envers les SPD de poissons qui semblerait due aux métabolites formés (Billiard et al. 2008, Fallahtafi et al. 2012, Incardona et al. 2009, Incardona et al. 2004). Le mélange pétrogénique lourd issu du pétrole *Erika*, s'est avéré plus toxique que le mélange pétrogénique léger issu du pétrole *Arabian Light*, lui-même plus toxique que l'extrait pyrolytique.

L'étude de la toxicité de ces trois mélanges a ensuite été approfondie avec le modèle médaka japonais (article n° 5), en utilisant les indicateurs individuels classiquement utilisés ainsi que ceux développés pour le médaka (article n°3). Les extraits HAP ont induit des effets au niveau du développement et de la croissance des larves. Le syndrome du BSD avait déjà été documenté chez le médaka pour divers HAP (Kiparissis et al. 2003, Rhodes et al. 2005, Vicquelin et al. 2011). Les fractions ont également provoqué des dommages à l'ADN. De la même manière, des adultes d'*Oreochromis niloticus* exposés à des effluents de pétrole avaient présenté une induction de la fréquence des micronoyaux (Çavaş & Ergene-Gözükara 2005). Tout comme les expériences présentées dans les articles n° 2 et 3, l'exposition aux HAP a altéré les capacités de nage des larves de médaka. Cette perturbation pourrait être liée à des effets narcotiques, des altérations de la voie des neurotransmetteurs, ou des perturbations endocriniennes (Barron 2002, Gesto et al. 2009). Les résultats obtenus avec le MELAc étaient en accord avec les résultats précédents obtenus avec le test embryo-larvaire truite (article n°4). Cependant des différences en termes de température, photopériode et salinité ont pu modifier la désorption des HAP (Barron et al. 2003, Faksness et al. 2008, Turner & Rawling 2001). Les fractions pétrogéniques se sont avérées les plus toxiques pour les deux espèces. Par ailleurs, les résultats du test des comètes et celui des MN étaient différents entre les deux espèces. La génotoxicité des fractions aromatiques a été révélée par le test des MN pour le médaka et par le test des comètes pour la truite. Le médaka se développant plus rapidement que la truite, les cellules présentent un index mitotique plus important. Les dommages à l'ADN pourraient donc être fixés plus rapidement chez le médaka. La truite a été plus sensible à la toxicité de la fraction pétrogénique *Erika* qu'à celle d'*Arabian Light*, ce qui n'a pas été aussi marqué pour le médaka. Des différences de sensibilité ont été documentées dans la littérature pour ces deux espèces (Dobbins et al. 2008, Orrego et al. 2011). Le **Tableau 24** rassemble les LOEC obtenues à l'aide des deux tests embryo-larvaires truite et médaka. L'établissement de LOEC est limité par le nombre de concentrations testées : trois concentrations différentes ont été testées pour chacun des extraits avec le MELAc, et seulement deux avec le test truite.

Tableau 24. LOEC (somme des HAP $\mu\text{g.g}^{-1}$) des fractions aromatiques pyrolytique, *Arabian Light* et *Erika*.

	Pyrolytique		<i>Arabian Light</i>		<i>Erika</i>	
	Médaka	Truite	Médaka	Truite	Médaka	Truite
Survie	-	-	-	-	-	-
Taux d'éclosion	-	-	3,6(1X)	-	4,0(1X)	4,8(1X)
Rythme cardiaque	-	nd ¹	-	nd	-	nd
Temps de développement	11,8(3X)	-	-	-	-	-
Biométrie	11,8(3X)	-	0,5(0,3X)	0,7(0,3X)	0,7(0,3X)	1,3(0,3X)
Tératogénicité	11,8(3X)	4,2(1X)	0,5(0,3X)	0,7(0,3X)	-	1,3(0,3X)
Locomotion des larves	11,8(3X)	nd	0,5(0,3X)	nd	0,7(0,3X)	nd
Génotoxicité test des comètes	-	-	-	4,1(1X)	-	1,3(0,3X)
Génotoxicité test des micronoyaux	0,8(0,3X)	-	0,5(0,3X)	-	-	-

- : pas de toxicité observée aux concentrations testées ; ¹ non déterminé

La biodisponibilité, la bioaccumulation et l'expression de gènes d'intérêt après exposition de médaka japonais à ces 3 fractions aromatiques ont ensuite été étudiées (article n°6). Des analyses chimiques du sédiment, de la colonne d'eau et des tissus des embryons ont démontré la biodisponibilité des contaminants pour les SPD de médaka. La bioaccumulation des HAP dans les tissus des embryons était très faible. Ce phénomène a été rapporté seulement pour l'exposition à la fraction *Erika*. Le sédiment dopé à cette fraction présentait la plus forte concentration. D'autre part, des analyses moléculaires par RT-qPCR ont confirmé la modulation de la transcription de gènes impliqués dans les mécanismes de l'apoptose, de la réparation des dommages de l'ADN (*p53*), du stress oxydant (*sod* *Cu*) et du métabolisme mitochondrial (*12s* et *coxI*). (Jung et al. 2009) ont également noté l'induction de dommages mitochondriaux induits par des mélanges de HAP. La surexpression du gène *cyp1a* chez les individus exposés suggère une possible activation de la voie de l'Ahr et des voies de biotransformation. Cela pourrait en partie expliquer la tératogénicité renseignée dans l'article précédent. La modulation de l'expression de *cyp19b* impliquée dans la production de l'aromatase a révélé le potentiel perturbateur endocrinien du mélange pyrolytique et issu du pétrole *Erika*. Cette exposition a également provoqué la répression de *rara1*. Ce gène est impliqué dans le métabolisme de la vitamine A et dans la transduction du signal dans la rétine (Duester 2000). Chez les jeunes stades de développement de poissons les changements d'expression de ces deux gènes *cyp19b* et *rara1* ont été reliés à des modifications de la locomotion des larves (Callard et al. 2001, Cowden et al. 2012, Tchoudakova et al. 2001). Bien que les fractions aient induit des dommages à l'ADN, l'état stationnaire des niveaux d'expression de *gadd45*, *ogg1* et *rad23* n'a pas confirmé la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN. Ces profils d'expression génique ont en partie clarifié le mode d'action des mélanges de HAP qui est présenté dans la figure ci-après. Excepté pour l'expression du gène *cyp1A*, les expressions des gènes étudiés n'ont pas semblé corrélées aux concentrations de HAP dans les mélanges. Contrairement aux indicateurs individuels, ces indicateurs moléculaires, se sont avérés moins sensibles pour comparer le gradient de toxicité des trois mélanges de HAP.

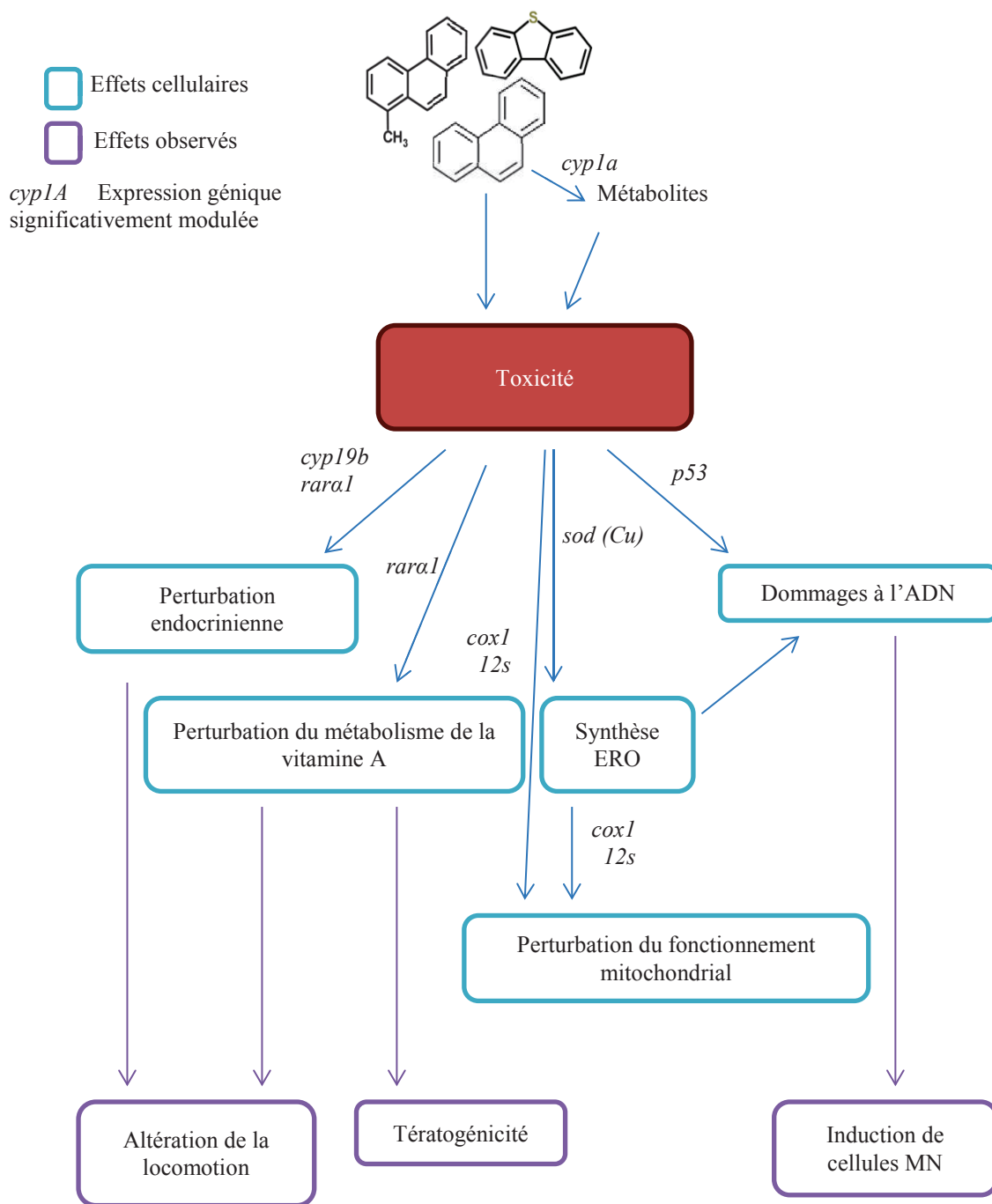


Figure 35. Implications des gènes *cyp1a*, *p53*, *sod(Cu)*, *coxI*, *12s*, *rara1* et *cyp19b* dans l’embryotoxicité des mélanges de HAP sur SPD de médaka japonais.

2 Pertinence du travail et perspectives

2.1 Sensibilité des marqueurs

Il est important d'estimer la sensibilité des marqueurs développés pour évaluer leur pertinence. Parmi tous les tests MELAc effectués au cours de cette étude, plusieurs expériences réalisées dans des conditions identiques d'exposition et d'analyses sont comparées dans le **Tableau 25** ci-dessous. La sensibilité des différents paramètres du MELAc a été comparée à partir de l'ensemble de ces expériences. Chacun des tests a été effectué pour plusieurs concentrations de HAP et plusieurs paramètres ont été suivis. Les paramètres ayant répondu à la plus faible concentration testée sont considérés les plus sensibles.

Tableau 25. Sensibilité des différents marqueurs du test MELAc. Les embryons de médaka ont été exposés au contact du sédiment artificiellement enrichi en HAP pendant tout le temps de leur développement. Les marqueurs ayant répondu à la plus faible concentration testée sont indiqués par le symbole X.

Marqueurs	BaA	Pyrolytique	<i>Arabian Light</i>	<i>Erika</i>
Survie embryonnaire				
Survie larvaire				
Taux d'éclosion				
Rythme cardiaque				
Temps de développement				
Temps d'éclosion 1/2				
Biométrie (longueur totale)			X	X
Biométrie (longueur tête)				
Biométrie (aire du sac vitellin)				X
Larves malformées	X		X	
Œdème				
Malfo. Squelettique				
Malfo. Cranio-faciale	X			
Malfo. Oculaire				
Malfo. Cardiovasculaire				
Locomotion des larves (distance parcourue)	X		X	X
Génotoxicité test des comètes	nm ¹			
Génotoxicité test des micronoyaux	X	X	X	

¹nm : non mesuré

L'étude de la toxicité du BaA et des trois mélanges aromatiques a révélé deux paramètres particulièrement sensibles : la mesure de la locomotion des larves et le test des micronoyaux. Leur inclusion dans le test MELA est donc tout à fait justifiée.

2.1.1 Tests de génotoxicité comète et micronoyaux

La sensibilité du test comète mis en œuvre dans ce travail est en accord avec les précédentes études sur larves entières de médaka japonais (Barjhoux 2011, Vicquelin 2011). Ce marqueur avait été évalué pertinent mais peu sensible à la présence des HAPs qui forment essentiellement des adduits, non détectable par le test des comètes. Le test des micronoyaux, en détectant les effets clastogènes, complète la caractérisation des dommages à l'ADN. Lorsqu'ils sont réalisés conjointement à partir des mêmes échantillons cellulaires de larves entières, ces deux tests de génotoxicité permettent d'évaluer des réponses précoces incluant un large nombre de dommages possibles (cassures simples et doubles brins, sites alkali labiles) prédisant des effets mutagènes qui apparaîtraient à des stades tardifs. D'autres marqueurs permettraient une vision plus complète des différents types de dommages possibles comme par exemple la mesure d'adduits à l'ADN et des bases oxydés de l'ADN.

Le test des micronoyaux consiste en un comptage manuel fastidieux d'un millier de cellules pour chaque échantillon. L'automatisation du comptage notamment avec l'utilisation du cytomètre de flux offrirait la possibilité d'observer un plus grand nombre de cellules (Sánchez et al. 2000). Cela pourrait réduire également la variabilité de réponses entre opérateurs et augmenter la sensibilité du test.

2.1.2 Test de locomotion

Les tests de locomotion sont recommandés par l'Union Européenne pour l'évaluation du caractère neurotoxique d'une substance chimique (OCDE 2007). Le test de locomotion sur larves de médaka japonais permet une réponse intégrative de différentes altérations de l'organisme. Ces altérations peuvent révéler une altération structurale ou fonctionnelle du système musculaire ou nerveux (altération du transport du signal, viabilité des cellules nerveuse) mais également des altérations du métabolisme énergétique. Cependant les mécanismes d'action reliant la toxicité des contaminants hydrophobes aux déficiences de locomotion restent incertains. La mesure communément réalisée des teneurs en acétylcholine-estérase indiquerait des dysfonctionnement neurologiques (Van der Oost et al. 2003). Il serait aussi envisageable de caractériser les possibles zones de lésions du système nerveux par l'utilisation de lignées transgéniques (Brion et al. 2012), ou encore de méthode de marquage du système de vision (Cowden et al. 2012). Il serait également possible d'étudier la locomotion des larves de truite arc-en-ciel à l'émergence. Cela nécessiterait davantage d'équipements pour mesurer plusieurs microplaques en même temps et pour stabiliser la température à 10 °C avec un minimum de variations. D'autres tests de comportement seraient aussi envisageables comme par exemple l'étude du comportement de prédation des larves au début de l'alimentation exogène (Couillard et al. 2011), ou l'étude du niveau d'anxiété (Schnörr et al. 2012).

2.1.3 Biométrie et malformations

Le pourcentage de malformations ainsi que la mesure de la biométrie des larves à l'éclosion sont également des marqueurs sensibles qui ont fréquemment répondu à l'exposition aux HAP au cours de ce travail de recherche. Les différents types de malformations rapportées permettent un aperçu global des dommages morphologiques possibles sur l'organisme. Quant aux mesures biométriques, elles permettent de révéler des perturbations métaboliques de l'organisme suite à l'exposition. Par exemple, la mesure de la surface du sac vitellin informe

de la consommation des réserves qui peut être perturbée (excès ou carence) dans le cas de larves contaminées.

Parmi les malformations des larves de médaka à l'éclosion, un gradient de sévérité des différents types de malformations a été observé à travers les différentes études. Les malformations cranio-faciales, en particulier de la forme de la mâchoire, étaient observées dès les plus faibles concentrations. Aux concentrations moyennes, des malformations cardiaques apparaissaient. Aux plus fortes concentrations de HAP, les œdèmes péri-cardiaques et vitellins ont été rapportés. Dans le cas des larves de truite arc-en-ciel, des hémorragies au niveau de différentes zones de l'organisme ont été observées en grand nombre (jusqu'à 20 % chez les témoins).

2.1.4 Activités physiologiques

De récentes études soulignent l'importance de la cardiotoxicité dans les mécanismes de toxicité des HAP (Incardona et al. 2009, Incardona et al. 2004, Matson et al. 2008a). Pourtant la mesure du rythme cardiaque sur les embryons de médaka japonais s'est avérée peu sensible à la présence de contaminants hydrophobes. Cela avait déjà été constaté au cours de précédents travaux (Barjhoux 2011, Vicquelin 2011). Il serait intéressant d'approfondir l'étude de ce paramètre, par exemple en couplant la mesure à des techniques d'imageries confocales et des marquages immuno-fluorescents. Cela permettraient une visualisation des cellules du myocarde et des protéines qui y sont synthétisées (Incardona et al. 2009). Il serait également possible d'évaluer le flux sanguin et l'organisation des arcs branchiaux par des techniques d'analyses vidéo ou de coloration (Hornung et al. 1999). Cependant ces méthodes ont été développées pour l'étude des mécanismes d'action, et ont été réalisées à des concentrations de contaminants très élevées non représentatives de l'environnement. Le rythme cardiaque pourrait aussi être mesuré sur les SPD de truites arc-en-ciel. Tout comme la mesure de locomotion sur cette espèce, cela nécessiterait un maintien de la température de la mesure à une valeur proche de 10 °C. De même, l'effet des HAP sur la consommation d'oxygène des embryons et larves pourrait être mesurée à l'aide de respiromètres (Castanheira et al. 2011, Finn et al. 1995).

Les marqueurs de locomotion, biométrie, et rythme cardiaque sont réalisés au niveau individuel. Il serait intéressant d'en développer davantage afin de pouvoir corréler les réponses moléculaires aux réponses cellulaires, puis phénotypiques. Par exemple les mesures d'expression génique pourraient être réalisées au niveau individuel sur un seul embryon, ou larve de médaka poisson. Par ailleurs des méthodes non invasives de mesure d'activité EROD déjà développées sur *Fundulus heteroclitus* (Le Bihanic et al. 2013, Nacci et al. 1998), pourraient être ajoutées aux marqueurs utilisés dans ces travaux.

Un des objectifs de ConPhyPoP était de développer des tests embryo-larvaires adaptés aux composés hydrophobes en utilisant les mélanges de HAP comme composés modèles. A travers ces recherches, le panel d'indicateurs précoces a été élargi et de ce fait a rendu les tests embryo-larvaires plus sensibles et plus efficaces pour prédire l'impact écotoxicologique des molécules étudiées.

2.2 Intérêts et limites des bioessais

2.2.1 Evaluation de la toxicité et écotoxicité de contaminants

La toxicité des polluants hydrophobes est contrôlée par la biodisponibilité du composé pour l'organisme. Elle est régie par les interactions entre le contaminant et les différents composants du sédiment sur la phase particulaire ou dissoute. En exposant les embryons au contact du sédiment, seule la fraction biodisponible du contaminant est absorbée par l'organisme. L'exposition par sédiment contact se rapproche ainsi d'une réalité environnementale. Ces tests sont aussi applicables pour le suivi de la qualité de masses d'eau en utilisant d'autres modes d'exposition des embryons, comme par exemple l'exposition à des éluviats de sédiment, à l'eau interstitielle ou à la phase particulaire uniquement. Les seuils de toxicité mesurés dans ces études pour des composés purs pourraient permettre de définir plus précisément des $PNEC_{\text{sédiment}}$.

Les tests embryo-larvaires truite et MELAc proposés dans ces travaux de recherche offrent une alternative aux tests recommandés par la législation en vigueur. En effet, ces stades de poissons ne sont pas protégés par la réglementation européenne (EC 2010). De plus les espèces *Oncorhynchus mykiss* et *Oryzias latipes* sont toutes deux recommandées par l'OCDE pour l'évaluation de la toxicité de substances (OCDE 1992, 1998). Ces tests proposent des marqueurs non invasifs : biométrie, malformation, comportement. Plusieurs de ces marqueurs peuvent être mesurés sur un même individu et ainsi réduire le nombre d'individus nécessaires. Les protocoles développés tendent également à limiter la douleur des embryons et larves en pratiquant l'anesthésie avant toute mesure qui pourrait être inconfortable pour l'organisme. Ils respectent ainsi les recommandations éthiques des 3R « *reduce, refine and replace* ».

Le rôle des poissons dans l'évaluation de la toxicité de sédiments a été discuté dans une revue d'Hallare et al. (2011). Parmi les différents protocoles présentés, les cultures cellulaires de poissons représentent une méthode alternative aux tests sur organismes entiers. Ces cultures peuvent correspondre soit à des lignées cellulaires établies soit à des cultures primaires et provenir de différents tissus de l'organisme : foie, branchies, gonades, macrophages, muscles etc. De telles approches permettent de réduire les contraintes éthiques, économiques, le temps d'expérience, de manipulation et la variabilité d'échantillons de tests sur SPD ou poissons adultes. L'étude porte alors sur des actions spécifiques de contaminants au niveau cellulaire, sans tenir compte de la réponse globale de l'organisme et des interactions possibles.

2.2.2 Comparaison inter-modèles expérimentaux

Différentes espèces modèles ont été utilisées au cours de ce projet. Le médaka japonais et le poisson zèbre sont largement utilisés en écotoxicologie. Ils sont originaires d'Asie du sud, leur élevage et reproduction sont aisés et peuvent avoir lieu tout au long de l'année. À l'inverse les salmonidés se développent plus lentement et présentent une réalité environnementale par rapport aux espèces présentes dans nos cours d'eau. Ces espèces sont donc complémentaires pour l'évaluation du risque des substances chimiques et de la qualité des milieux.

Des différences de sensibilité entre les espèces sont apparues. En effet en comparaison avec le médaka japonais, le poisson zèbre a très peu répondu aux contaminants hydrophobes. De par son développement embryonnaire plus long au contact du sédiment contaminé, le médaka japonais semble plus adapté à l'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes enrobées sur sédiment artificiel que le poisson zèbre.

Malgré des différences d'exposition entre le médaka japonais et la truite arc-en-ciel (température, salinité, photopériode), des similitudes ont pu être observées entre les réponses des deux espèces. L'incubation des embryons de truite sur graviers a nettement réduit la mortalité des individus comparativement à l'incubation sur sédiment naturel. Parallèlement, des embryons de médaka japonais ont été exposés à des concentrations similaires de BaP enrobé sur sédiment naturel (Chapitre II 2.2 Expérience 1) et sédiment artificiel (articles n°1 et 2). La matrice artificielle a permis une biodisponibilité plus importante des molécules de BaP. L'utilisation d'une matrice artificielle d'exposition s'est révélée adéquate dans le cas des deux tests embryo-larvaires pour la détection des effets toxiques des HAP.

Cette approche multi modèle a permis de confirmer les résultats obtenus entre les espèces, et d'étudier leur transposition d'une espèce à l'autre. Les résultats obtenus avec la truite et le médaka étaient comparables en termes de spectre de toxicité et de gradient de toxicité entre les 3 mélanges testés.

2.2.3 Perspectives concernant les bioessais

Les conditions contrôlées des bioessais tendent à se rapprocher des conditions expérimentales en particulier en considérant des concentrations d'exposition comparables aux concentrations des habitats naturels des espèces (Cachot et al. 2006, Guzzella et al. 2005, Karlsson et al. 2008). Cependant certains paramètres peuvent modifier la toxicité et la biodisponibilité des contaminants. Les protocoles expérimentaux proposés ne tiennent pas compte des phénomènes de marée impliquant des différences de salinité, de température, et d'oxygène. Les bioessais sur sédiments dopés pourraient donc surestimer la biodisponibilité et donc la toxicité des composés testés. Il serait par conséquent intéressant d'approfondir les effets des HAP en mélange avec des approches multi-stress. Par exemple en exposant les individus aux mélanges de HAP à différentes températures, taux d'oxygène ou salinités.

De même l'allongement de la période des tests permettrait d'augmenter la sensibilité des tests. L'exposition des truites arc-en-ciel pourrait débuter quelques heures après la fécondation des œufs. L'étude de la transition de l'alimentation endogène vers l'alimentation exogène, phase clé du développement des organismes aquatiques, permettrait d'évaluer le caractère labile des anomalies morphologiques ainsi que les conséquences de la consommation totale des réserves vitellines où s'accumulent les composés hydrophobes.

Dans cette étude les bioessais ont été développés en conditions contrôlées de laboratoire. Il est facilement envisageable de transposer ces outils à plus grande échelle, en particulier pour le test embryo-larvaire truite, pour des expositions en mésocosme ou *in situ*. Des expériences préliminaires non présentées dans ce manuscrit ont déjà été réalisées. Les espèces de poissons modèles choisies pour ce travail, truite arc-en-ciel et médaka japonais, apportent de nombreux avantages de manipulation et de disponibilité des embryons mais ne sont pas originaires des écosystèmes aquatiques européens. Il serait intéressant de travailler avec des espèces de salmonidés originaires de nos cours d'eau comme par exemple la truite fario *Salmo trutta*, ou encore la saumon de l'atlantique *Salmo salar*. Un protocole expérimental envisageable serait d'incuber les embryons au contact de graviers en mésocosme, par exemple des rivières artificielles, dans des unités expérimentales ne permettant pas leur fuite mais une contamination chronique du milieu. Les substances hydrophobes à tester seraient injectées directement dans l'eau des mésocosmes et s'adsorbent peu à peu aux graviers. Contrairement aux conditions en laboratoire, les températures naturelles hivernales allongeraient le temps de développement des embryons et des pro-larves et affecteraient la biodisponibilité des composés mais aussi les réponses des organismes. Les paramètres de

survie, de biométrie, de malformations pourraient être suivis régulièrement au cours de l'exposition.

Les tests embryo-larvaires poisson pourraient être aisément appliqués à la gestion des milieux aquatiques en permettant une surveillance de la qualité des masses d'eau. Des embryons d'une espèce locale seraient alors engagés dans des dispositifs expérimentaux et déposés au contact du lit de la rivière. Différents paramètres seraient évalués sur le terrain à savoir : la toxicité aigüe, la biométrie et la tératogénicité. Des échantillons pourraient être prélevés pour analyser à posteriori en laboratoire la génotoxicité et l'altération du comportement.

2.3 Evaluation de la toxicité de mélange de HAP

Le chapitre I détaillait les méthodes de facteurs d'équivalent toxique (FET) afin d'évaluer la toxicité d'une substance vis-à-vis d'un composé de référence qui peut être le BaP ou le TCDD. Ces méthodes ont été appliquées pour calculer le TEQ de chacun des mélanges de HAP testés suivant la formule (**Tableau 26**):

$$TEQ_{\text{mélange}} = \sum FET_i \times [HAP_i]$$

Où *i* correspond à chaque HAP constituant le mélange

Tableau 26. Calcul des TEQ des 3 mélanges vis-à-vis du BaP et du TCDD. Seulement les 16 HAP de l'US EPA ont été pris en considération. Le dibenzo[*ah*]anthracène co-élue avec le dibenzo[*ac*]anthracène et le chrysène avec le triphénylène, leur concentrations ont donc été prise en compte dans le calcul.

	Proportion en HAP (%)			FET vis-à-vis du BaP ^a	vis-à-vis du TCDD ^b
	Pyrolytique	<i>Arabian Light</i>	<i>Erika</i>		
Naphtalène	2	40	7	0.001	Inactif
Acénaphthylène	1	0	0	0.001	Inactif
Acénaphtène	1	1	3	0.001	Inactif
Fluorène	1	16	5	0.001	Inactif
Phénanthrène	7	29	22	0.001	Inactif
Anthracène	3	0	3	0.01	Inactif
Fluoranthène	14	2	2	0.001	2.00E-09
Pyrène	12	2	11	0.001	3.85E-07
Benzo[<i>a</i>]anthracène	8	0	9	0.1	2.00E-04
Chrysène	10	7	21	0.01	6.59E-05
Benzo[<i>b+k+j</i>]fluoranthène	17	2	5	0.1	6.90E-04
Benzo[<i>a</i>]pyrène	8	0	4	1	2.44E-04
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène	8	0	0	0.1	1.88E-03
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène	2	0	1	1	2.72E-04
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène	7	1	7	0.01	1.02E-05
TEQ (BaP)^a	13.3	0.8	7.5		
TEQ (TCDD)^b	0.032	0.002	0.009		

^a(INERIS 2003) ^b(Barron et al. 2004b)

Le test embryo-larvaire truite n'a révélé aucun effet génotoxique de la fraction aromatique pyrolytique. Dans le cas du médaka japonais, cette même fraction a certes induit des effets mesurés par le test des micronoyaux mais c'était le cas également pour la fraction issue du pétrole *Arabian Light*. La fraction *Arabian Light* est pourtant supposée être la moins toxique par les méthodes de calcul proposés par l'INERIS (2003). Le potentiel agoniste de liaison à l'Ahr pourrait expliquer une partie des effets mesurés, comme par exemple la tératogénicité. Ceci n'est pas vérifié par les TEQ proposés par (Barron et al. 2004b). Le caractère additif de la toxicité de HAP en mélange est contredit par l'ensemble de ces résultats comme cela a déjà été démontré par (Billiard et al. 2008).

D'après ces deux calculs de TEQ la fraction pyrolytique serait plus toxique que l'*Erika*, elle-même plus toxique que l'*Arabian Light*. Ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus à l'aide des tests embryo-larvaires. Ces méthodes de calculs semblent donc inadaptées à l'évaluation de toxicité de mélanges complexes de HAP sur embryons et larves de poisson. Le calcul de TEQ vis-à-vis du BaP se concentre sur les propriétés cancérigènes des HAP tandis que le calcul vis-à-vis du TCDD se base sur le potentiel de liaison à l'Ahr. L'INERIS (2003) renseigne que le choix du benzo[a]pyrène comme composé de référence paraît adapté pour des mélanges comportant des HAP de 4 à 7 noyaux aromatiques non substitués. Le classement TEQ des molécules diffère suivant le mode d'action ciblé : cancérigène ou Ahr agoniste. (Billiard et al. 2008) soulignent le fait que les HAP ne sont pas similaires à la dioxine en terme de structure, de persistance et de bioaccumulation ; et que certains effets des HAP ne peuvent être expliqués par la liaison à l'Ahr. Il est en effet délicat de ne prendre en compte qu'un seul mode d'action pour l'évaluation de la toxicité des HAP. Ces méthodes de calcul ont été mises au point sur poissons adultes et ne prennent pas en compte les effets sur le développement des SPD de poissons. Les HAP induisent des effets divers à travers plusieurs modes d'action. Chacun d'entre eux nécessiterait un classement de FET. Un FET moyen intégrant les différents modes d'action pourrait être établi pour chaque composé.

D'autre part, l'approche de calcul TEQ est basée sur l'hypothèse de l'additivité des risques des HAP dans un mélange et ne tient donc pas compte des interactions synergiques ou antagonistes qui peuvent avoir lieu entre les molécules.

Les résultats de ces travaux de recherche ont montré que la toxicité des molécules seules ou en mélanges n'était pas linéaire par rapport au nombre de cycles des molécules. En effet en considérant l'ensemble des paramètres mesurés, le Fluo s'est avéré plus toxique que le BaA, lui-même plus toxique que le BaP. De la même manière les mélanges aromatiques d'origine pétrogéniques se sont avérés plus toxiques que le mélange pyrolytique et ce vis-à-vis des SPD de médaka japonais et de truite arc en ciel. Que ce soit la réglementation DCE, REACH ou de l'USEPA, la toxicité des HAP alkylés et soufrés n'est pas prise en considération bien que ces composés sembleraient être plus toxiques que leur composé parent (Rhodes et al. 2005, Turcotte et al. 2011). C'est pourquoi il est nécessaire d'élargir le spectre de molécules de HAP mesurées au-delà des 16 HAP recommandés par l'USEPA. Malgré le fait que peu de données soient disponibles pour ces HAP soufrés, ces molécules ainsi que les HAP méthylés concourent de la toxicité des extraits d'origine pétrogénique.

Dans le cadre du projet ConPhyPoP, des poissons zèbre ont été exposés aux trois mêmes mélanges de HAP du premier repas jusqu'au neuvième mois (Vignet et al. *soumis*). De nombreuses fonctions physiologiques ont été étudiées dont le métabolisme énergétique, le comportement, la croissance, le métabolisme respiratoire et digestif, la reproduction, l'osmorégulation ainsi que l'immunité. La comparaison des effets produits par les mélanges a révélé une toxicité majeure pour la fraction *Erika* chez les juvéniles et adultes, puis une toxicité décroissante pour la fraction *Arabian Light* puis pyrolytique. Les tests sur juvéniles et adultes apportent des informations complémentaires sur les fonctions physiologiques altérées

par rapport aux tests sur SPD. Cependant concernant l'évaluation de risque pour les milieux aquatiques, les tests embryo-larvaires permettent d'obtenir les mêmes résultats mais pour un temps considérablement réduit. Ces deux approches ont permis de classer les trois fractions étudiées en fonction de leur toxicité : fraction pyrolytique < pétrole léger *Arabian Light* = pétrole lourd *Erika*.

Cette étude a souligné le risque que représentent les mélanges de HAP pour les organismes aquatiques. Les embryons et larves de poissons se sont révélés particulièrement sensibles à ce type de polluants. Les nouvelles réglementations devraient donc considérer d'avantage ce risque pour les premiers stades de vie des organismes aquatiques.

Références

- Abarnou A, Burgeot T, Chevreuil M, Leboulanger F, Loizeau V, Agnès M-J, Minier C (2000): Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant? Editions Ifremer 13, 35
- AGFC (2011): Fishing by Species
- Ahlf W, Hollert H, Neumann-Hensel H, Ricking M (2002): A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality - A german approach based on ecotoxicological and chemical measurements. J. Soils Sed. 2, 37-42
- Akkanen J, Tuikka A, Kukkonen JVK (2012): On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ecotoxicol. Environ. Saf. 78, 91-98
- ATSDR 1995: Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA
- Baars B-J (2002): The wreckage of the oil tanker "Erika" - human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. Toxicol. Lett. 128, 55-68
- Baker JE, Eisenreich SJ, Eadie BJ (1991): Sediment trap fluxes and benthic recycling of organic carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorobiphenyl congeners in Lake Superior. Environ. Sci. Technol. 25, 500-509
- Barbee GC, Barich J, Duncan B, Bickham JW, Matson CW, Hintze CJ, Autenrieth RL, Zhou G-D, McDonald TJ, Cizmas L, Norton D, Donnelly KC (2008): *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 454-464
- Barjhoux I 2011: Etude de la biodisponibilité et de la toxicité de polluants chimiques à risque dans les sédiments aquatiques vis-à-vis des premiers stades de développement d'un poisson modèle, *Oryzias latipes*, Université Bordeaux I, Talence, 381 pp
- Barjhoux I, Baudrimont M, Morin B, Landi L, Gonzalez P, Cachot J (2012): Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 79, 272-282
- Barron MG (2002): Environmental Contaminants Altering Behaviour. In: Dell'Omo G (Editor), Behavioural Ecotoxicology. John Wiley & Sons Ltd, Chichester
- Barron MG, Carls MG, Short JW, Rice SD (2003): Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered alaska north slope crude oil to pacific herring eggs and larvae. Environ. Toxicol. Chem. 22, 650-660
- Barron MG, Carls MG, Heintz R, Rice SD (2004a): Evaluation of Fish Early Life-Stage Toxicity Models of Chronic Embryonic Exposures to Complex Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures. Toxicol. Sci. 78, 60-67
- Barron MG, Heintz R, Rice SD (2004b): Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. Mar. Environ. Res. 58, 95-100

- Baršienė J, Dedonytė V, Rybakovas A, Andreikėnaitė L, Andersen OK (2006): Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.* 78, Supplement, S99-S104
- Bartzke M, Delov V, Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Oehlmann J (2010): Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the Water Framework Directive approach. *J. Soils Sed.* 10, 389-399
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47, 415-439
- Berthe-Corti L, Höpner T (2005): Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 219, 171-189
- Billiard SM, Querbach K, Hodson PV (1999): Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2070-2077
- Billiard SM, Hahn ME, Franks DG, Peterson RE, Bols NC, Hodson PV (2002): Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 55-68
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008): Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol. Sci.* 105, 5-23
- Bittner M, Macikova P, Giesy JP, Hilscherova K (2011): Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environ. Int.* 37, 960-964
- Bony S, Gillet C, Bouchez A, Margoum C, Devaux A (2008): Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89, 197-203
- Brannon EL, Collins K, Cronin MA, Moulton LL, Maki AL, Parker KR (2012): Review of the *Exxon Valdez* oil spill effects on pink salmon in Prince William Sound, Alaska. *Rev. Fish. Sci.* 20, 20-60
- Brinkmann M, Hudjetz S, Kammann U, Hennig M, Kuckelkorn J, Chinoraks M, Cofalla C, Wiseman S, Giesy JP, Schäffer A, Hecker M, Wölz J, Schüttrumpf H, Hollert H (2013): How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 13-24
- Brinkworth LC, Hodson PV, Tabash S, Lee P (2003): CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene J. *Toxicol. Environ. Health, A* 66, 627-646
- Brion F, Le Page Y, Piccini B, Cardoso O, Tong S-K, Chung B-c, Kah O (2012): Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In Vivo* Using Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7, e36069
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P (1997): Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58, 85-97

- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, Le Menach K, Garrigues P (2000): Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 165-171
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006): Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257-267
- Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2007): Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830-7836
- Cachot J, Minier C, Law M, Didier PC, Schleis J, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, Winn R (2008): The use of embryos of the Lambda *cII* transgenic medaka to assess short and long term effects of sediment-sorbed pollutants: Application to sediments of the Seine estuary (Normandy, France). *Mar. Environ. Res.* 66, 65-65
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Souissi S, Hilde D, LeMenach K, Budzinski H (2007): Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïd, copepod). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Peluhet L, LeMenach K, Souissi S, Budzinski H (2009): Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Pollut.* 157, 64-71
- Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E (2001): Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 305-314
- Carls MG, Rice SD, Hose JE (1999): Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 481-493
- Carls MG, Hose JE, Thomas RE, Rice SD (2000): Exposure of pacific herring to weathered crude oil: Assessing effects on ova. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1649-1659
- Carls MG, Holland L, Larsen M, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP (2008): Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquat. Toxicol.* 88, 121-127
- Carls MG, Meador JP (2009): A Perspective on the Toxicity of Petrogenic PAHs to Developing Fish Embryos Related to Environmental Chemistry. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 1084-1098
- Carls MG, Thedinga JF (2010): Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Mar. Environ. Res.* 69, 318-325

- Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT (2004): Benzo[*a*]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 40-52
- Carvalho PSM, Kalil DdCB, Novelli GAA, Bainy ACD, Fraga APM (2008): Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Mar. Environ. Res.* 66, 205-207
- Castanheira MF, Martins CIM, Engrola S, Conceição LEC (2011): Daily oxygen consumption rhythms of Senegalese sole solea senegalensis (Kaup, 1858) juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407, 1-5
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005): Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264-271
- Chapman PM, Wang F (2001): Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 3-22
- Chapman PM, Ho KT, Munns Jr W, Solomon KR, Weinstein MP (2002): Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 271-278
- Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RIL (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31-62
- Chikae M, Hatano Y, Ikeda R, Morita Y, Hasan Q, Tamiya E (2004): Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate and benzo[*a*]pyrene on the embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 16, 141-145
- Claissé D, Joanny M, Quintin JY (1992): Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analisis Mag* 20
- Classidy CL, Lemon JA, Boreham DR (2007): Impacts of low dose gamma-radiation on genotoxic risk in aquatic ecosystems. *Dose-response* 6, 323-332
- Couillard CM (2002): A microscale test to measure petroleum oil toxicity to mummichog embryos. *Environ. Toxicol.* 17, 195-202
- Couillard CM, Laplatte B, Pelletier É (2009): A fish bioassay to evaluate the toxicity associated with the ingestion of benzo[*a*]pyrene-contaminated benthic prey. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 772-781
- Couillard CM, Légaré B, Bernier A, Dionne Z (2011): Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. *Mar. Environ. Res.* 71, 257-265
- Cowden J, Padnos B, Hunter D, MacPhail R, Jensen K, Padilla S (2012): Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165-173
- Crespo A 2009: Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le bassin d'Arcachon, Université Bordeaux1, 458 pp

- Dégremont C, Cachot J (2009): La Génotoxicité, quel risque pour les espèces aquatiques? Fascicules Seine-Aval
- Depree CAMARC (2008): Polycyclic aromatic hydrocarbons in Auckland's aquatic environment : sources, concentrations and potential environmental risks. Auckland Regional Council, Auckland, N.Z.
- Di Toro DM, McGrath JA, Hansen DJ (2000): Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1951-1970
- Djomo JE, Garrigues P, Narbonne JF (1996): Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Environ. Toxicol. Chem. 15, 1177-1181
- Dobbins LL, Brain RA, Brooks BW (2008): Comparison of the sensitivities of common *in vitro* and *in vivo* assays of estrogenic activity: application of chemical toxicity distributions. Environ. Toxicol. Chem. 27, 2608-2616
- Duester G (2000): Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Eur. J. Biochem. 267, 4315-4324
- Dutta TK, Harayama S (2000): Fate of Crude Oil by the Combination of Photooxidation and Biodegradation. Environ. Sci. Technol. 34, 1500-1505
- EC (1994): Directive 1488/94/EC of the commission regulation laying down the principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances. In: regulation C (Hrsg.). Official Journal of the European Union, pp. 3-11
- EC (2000): Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Union, pp. 1-73
- EC (2006): Regulation (EC) N° 1907/2006 of the european parliament and of the concil concerning the Registration Evaluation and Authorization of Chemicals (REACH). Official Journal of the European Union
- EC (2008a): Directive 2008/105/EC of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy. Official Journal of the European Union, pp. 84-97
- EC (2008b): Directive 2008/56/CE établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin (directive-cadre "stratégie pour le milieu marin"). Official Journal of the European Union
- EC (2010): Directive 2010/63/EU of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, pp. 33-79
- Eisler R 1987: Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review, U.S. Fish and Wildlife Service
- Emran F, Rihel J, Adolph AR, Wong KY, Kraves S, Dowling JE (2007): OFF ganglion cells cannot drive the optokinetic reflex in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 19126-19131

- Escartin E, Porte C (1999): Biomonitoring of PAH pollution in high-altitude mountain lakes through the analysis of fish bile. *Environmental Science and Technology* 33, 406-409
- Faksness L-G, Brandvik PJ, Sydnés LK (2008): Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1746-1754
- Fallahtafti S, Rantanen T, Brown RS, Snieckus V, Hodson PV (2012): Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 106-107, 56-64
- Fanget B, Devos O, Naffrechoux E (2002): Pyrene transfer from clay particles to water: the role of humic acid. *Rev. Sci. Eau* 15, 95-108
- Farwell A, Nero V, Croft M, Bal P, Dixon DG (2006): Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 600-607
- Finn RN, Rønnestad I, Fyhn HJ (1995): Respiration, nitrogen and energy metabolism of developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 111, 647-671
- Fluvialnet (2013): Les régions navigables : Bassin de la Seine
- Gagné F, Douville M, André C, Debenest T, Talbot A, Sherry J, Hewitt LM, Frank RA, McMaster ME, Parrott J, Bickerton G (2012): Differential changes in gene expression in rainbow trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-affected water and the Athabasca River. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155, 551-559
- Gao Y, de Brauwere A, Elskens M, Croes K, Baeyens W, Leermakers M (*in press*): Evolution of trace metal and organic pollutant concentrations in the Scheldt River Basin and the Belgian Coastal Zone over the last three decades. *J. Mar. Syst.*
- Gaspard L, Machiwa JF, Mdachi SJM, Streck G, Brack W (2009): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the intertidal areas of Dar es Salaam, Tanzania. *Environ. Pollut.* 157, 24-34
- Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H (2003): Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481-490
- Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Míguez JM (2009): β -Naphthoflavone and benzo[a]pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 191-198
- Gonçalves R, Scholze M, Ferreira AM, Martins M, Correia AD (2008): The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ. Res.* 108, 205-213
- Guasch H, Ginebreda A, Geiszinger A, Akkanen J, Slootweg T, Mäenpää K, Leppänen M, Agbo S, Gallampois C, Kukkonen JK (2012): Bioavailability of organic contaminants in freshwater environments, Emerging and Priority Pollutants in Rivers. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 25-53

- Gustafson JB, Tell JG, Orem D (1997): Selection of representative TPH fractions based on fate and transport considerations
- Guzzella L, Roscioli C, Viganò L, Saha M, Sarkar SK, Bhattacharya A (2005): Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. *Environ. Int.* 31, 523-534
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C (1999): Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 45, 147-158
- Hallare A, Seiler T-B, Hollert H (2011): The versatile, changing, and advancing roles of fish in sediment toxicity assessment—a review. *J. Soils Sed.* 11, 141-173
- Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Köler H-R, Triebskorn R (2005): Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci. Total Environ.* 347, 254-271
- Hansen DJ, Di Toro DM, McGrath JA, Swartz RC, Mount DR, Burgess RM, Ozretich RJ, Bell HE, Linton TK (2003): Procedures for the derivation of equilibrium partitioning sediment benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms : PAH mixtures. USEPA, Narragansett, RI : Duluth, MN : Newport, Or.
- Harris JRW, Cleary JJ, Valkirs AO (1996): Particle-Water Partitioning and the Role of Sediments as a Sink and Secondary Source of TBT. In: Champ MA , Seligman PF (Editors), *Organotin*. Springer Netherlands, pp. 459-473
- Hatlen K, Sloan CA, Burrows DG, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP (2010): Natural sunlight and residual fuel oils are an acutely lethal combination for fish embryos. *Aquat. Toxicol.* 99, 56-64
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinae N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y (1998): Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 399, 125-133
- He C, Wang C, Zhou Y, Li J, Zuo Z (2012): Embryonic exposure to benzo(a)pyrene influences neural development and function in rockfish (*Sebastiscus marmoratus*). *Neurotoxicology*
- Heintz RA, Short JW, Rice SD (1999): Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 494-503
- Helmstetter MF, Alden RW (1995): Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Aquat. Toxicol.* 32, 1-13
- Hicken CE, Linbo TL, Baldwin DH, Willis ML, Myers MS, Holland L, Larsen M, Stekoll MS, Rice SD, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP (2011): Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7086-7090

- Hodson PV, Qureshi K, Noble CAJ, Akhtar P, Brown RS (2007): Inhibition of CYP1A enzymes by β -naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 81, 275-285
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003): A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sed.* 3, 197-207
- Hornafius JS, Quigley D, Luyendyk BP (1999): The world's most spectacular marine hydrocarbon seeps (Coal Oil Point, Santa Barbara Channel, California): Quantification of emissions. *J. Geophys. Res. (C Oceans)* 104, 20703-20711
- Hornung M, Spitsbergen J, Peterson R (1999): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 47, 40-51
- Hornung MW, Cook PM, Flynn KM, Lothenbach DB, Johnson RD, Nichols JW (2004): Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. *Aquat. Toxicol.* 67, 1-11
- Hornung MW, Cook PM, Fitzsimmons PN, Kuehl DW, Nichols JW (2007): Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Sci.* 100, 393-405
- IARC (2010): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans : Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, Lyon, France, pp. 1-853
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004): Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 191-205
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK, Scholz NL (2005): Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.* 113, 1755-1762
- Incardona JP, Day HL, Collier TK, Scholz NL (2006): Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 308-321
- Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK, Scholz NL (2009): Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ. Sci. Technol.* 43, 201-207
- Incardona JP, Linbo TL, Scholz NL (2011): Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257, 242-249
- INERIS 2000: Etude des risques des substances contenues dans le fioul transporté par ERIKA sur les écosystèmes aquatiques, Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte
- INERIS 2003: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes: Approche substance par substance et

- approche par mélange - Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérogènes: valeurs toxiques de référence, Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte
- INERIS 2005: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Guide méthodologique, Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude, Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte
- INERIS 2008: Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains. Rapport d'étude. DRC-07-82615-13836C, Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte
- IPCS 1998: Environmental Health Criteria 202: Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, International Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland
- IPCS 2002: Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Ch 4: Wildlife, International Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland
- ITIS (2013): Integrated Taxonomic Information system
- ITOPF 2013: Oil Tanker Spill Statistics 2012, The international tanker owners pollution federation limited, Canterbury, UK
- Iwamatsu T (2004): Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mech. Dev. 121, 605-618
- Jalabert B, Fostier A (2010): La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage. Synthèses. Quae
- Jones KD, Tiller CL (1999): Effect of Solution Chemistry on the Extent of Binding of Phenanthrene by a Soil Humic Acid: A Comparison of Dissolved and Clay Bound Humic. Environ. Sci. Technol. 33, 580-587
- Jung D, Cho Y, Collins LB, Swenberg JA, Di Giulio RT (2009): Effects of benzo[a]pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. Aquat. Toxicol. 95, 44-51
- Karlsson J, Sundberg H, Åkerman G, Grunder K, Eklund B, Breitholtz M (2008): Hazard identification of contaminated sites - ranking potential toxicity of organic sediment extracts in crustacean and fish. J. Soils Sed. 8, 263-274
- Kienzler A, Bony S, Devaux A (2013): DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. Aquat. Toxicol. 134-135, 47-56
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203, 253-310
- Kiparissis Y, Akhtar P, Hodson PV, Brown RS (2003): Partition-Controlled Delivery of Toxicants: A Novel *In Vivo* Approach for Embryo Toxicity Testing. Environ. Sci. Technol. 37, 2262-2266
- Kleinow KM, James MO, Tong Z, Venugopalan CS (1998): bioavailability and biotransformation of benzo[a]pyrene in an isolated perfused *in situ* catfish intestinal preparation. Environ. Health Perspect. 106

- Kocan RM, Matta MB, Salazar SM (1996): Toxicity of weathered coal tar for shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) embryos and larvae. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 161-165
- Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2006): A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2097-2106
- Lachambre M, Fisson C (2007): La contamination chimique : Quel risque en estuaire de Seine? Fiche substance. GIP Seine Aval
- Laor Y, Farmer WJ, Aochi Y, Strom PF (1998): Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. Water Res. 32, 1923-1931
- Le Bihanic F, Couillard CM, Rigaud C, Légaré B (2013): A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. Mar. Environ. Res. 84, 17-23
- Lee RF (2003): Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils. Spill Science & Technology Bulletin 8, 157-162
- Legendre P, Legendre L (1998): Numerical Ecology. Elsevier Science BV, Amsterdam, 853 pp
- Liu N, Ma M, Xu Y, Zha J, Rao K, Wang Z (2013): Susceptibility of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to 2,4,6-trichlorophenol-induced micronuclei in peripheral erythrocytes. Frontiers of Environmental Science & Engineering 7, 77-84
- Lotufo GR (1998): Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. Aquat. Toxicol. 44, 17-30
- Luo X-J, Chen S-J, Mai B-X, Yang Q-S, Sheng G-Y, Fu J-M (2006): Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. Environ. Pollut. 139, 9-20
- MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S (2009): Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. Neurotoxicology 30, 52-58
- Massa F, Baglinière J-L, Prunet P, Grimaldi C (2000): Survie embryo-larvaire de la truite (*Salmo trutta*) et conditions chimiques dans la frayère. Cybium 24, 129-140
- Matson CW, Clark BW, Jenny MJ, Fleming CR, Hahn ME, Di Giulio RT (2008a): Development of the morpholino gene knockdown technique in *Fundulus heteroclitus*: A tool for studying molecular mechanisms in an established environmental model. Aquat. Toxicol. 87, 289-295
- Matson CW, Timme-Laragy AR, Di Giulio RT (2008b): Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. Chemosphere 74, 149-154
- Mayer P, Fernqvist MM, Christensen PS, Karlson U, Trapp S (2007): Enhanced Diffusion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Artificial and Natural Aqueous Solutions. Environ. Sci. Technol. 41, 6148-6155

- McElroy AE, Bogler A, Weisbaum D, Norris M, Mendelman LV, Setlow R, Winn R (2006): Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo[α]pyrene dosed sediments. *Mar. Environ. Res.* 62, S273-S277
- Morin B, Filatreau J, Vicquelin L, Barjhoux I, Guinel S, Leray-Forget J, Cachot J (2011): Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2235-2242
- Motelay-Massei A, Ollivon D, Garban B, Chevreuil M (2003): Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters. *Atmos. Environ.* 37, 3135-3146
- Nacci D, Coiro L, Kuhn A, Champlin D, Munns W, Specker J, Cooper K (1998): Nondestructive indicator of ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity in embryonic fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2481-2486
- Navas JMa, Segner H (2000): Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* 51, 79-92
- NRC (2003): Executive summary. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. National Academy of Sciences, Washington, DC
- Nye JA, Davis DD, Miller TJ (2007): The effect of maternal exposure to contaminated sediment on the growth and condition of larval *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 82, 242-250
- OCDE (1992): Guidelines for the testing of chemicals fish early life stage toxicity test, Test No. 210. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development, pp. 1-18
- OCDE (1998): Guidelines for the testing of chemicals fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, Test No. 212. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development, pp. 1-18
- OCDE (2007): Guidelines for the testing of chemicals developmental neurotoxicity study, Test No. 426. Section 4: Health effects. Organization for Economic Cooperation and Development, pp. 1-18
- OCDE (2010): Guidelines for the testing of chemicals sediment-water chironomid life-cycle toxicity test using spiked sediment, Test No. 233. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development
- OCDE (2013): Guidelines for the testing of chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Test No. 236. Section 2: Effects on biotic systems. Organization for Economic Cooperation and Development
- Olive PL, Banáth JP (1995): Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the Comet Assay and a DNA crosslinking agent. *Exp. Cell Res.* 221, 19-26
- Oliveira M, Gravato C, Guilhermino L (2012): Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecol. Indicators* 19, 206-214

- Orrego R, Guchardi J, Beyger L, Krause R, Holdway D (2011): Comparative embryotoxicity of pulp mill extracts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American flagfish (*Jordanella floridae*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 104, 299-307
- OSPAR (1992): Convention pour la protection du milieu marin de l'atlantique du Nord-Est, Paris, 21-22 septembre 1992
- Ostrander GK, Rotchell J (2005): Fish models of carcinogenesis. In: Mommsen TP, Moon TW (Editors), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*
- Palmqvist A, Rasmussen LJ, Forbes VE (2006): Influence of biotransformation on trophic transfer of the PAH, fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 80, 309-319
- Pozo K, Perra G, Menchi V, Urrutia R, Parra O, Rudolph A, Focardi S (2011): Levels and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Lengua Estuary, central Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1572-1576
- Québec Gd (2009): Pleins feux sur la pêche à la truite arc-en-ciel
- Readman JW, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J, Villeneuve JP, Catinni C, Mee LD (2002): Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 48-62
- Reynaud S, Deschaux P (2006): The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 77, 229-238
- Rhodes S, Farwell A, Mark Hewitt L, MacKinnon M, George Dixon D (2005): The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 247-258
- Roberts DA (2012): Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. *Environ. Int.* 40, 230-243
- Rocha PS, Bernecker C, Strecker R, Mariani CF, Pompêo MLM, Storch V, Hollert H, Braunbeck T (2011): Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1951-1959
- Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010): Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci. Total Environ.* 408, 2054-2059
- Ruelle P (2000): The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics. *Chemosphere* 40, 457-512
- Russell WMS, Burch RL (1959): *The principles of humane experimental techniques*. Methuen, London, 238 pp
- Safe S (1993): Development of Bioassays and approaches for the risk assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 101, 317-325

- Sánchez P, Llorente MaT, Castaño A (2000): Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo[*a*]pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465, 113-122
- Schlenk D, Celander MC, Gallagher EP, George S, James M, Kullman SW, van den Hurk P, Willett K (2008): Biotransformation in fishes. In: Di Giulio RT, Hinton DE (Editors), *The toxicology of fishes*. CRC press, Florida
- Schnörr SJ, Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL (2012): Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain Res.* 228, 367-374
- Scott JA, Hodson PV (2008): Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and α -naphthoflavone. *Aquat. Toxicol.* 88, 200-206
- Scott JA, Incardona JP, Pelkki K, Shepardson S, Hodson PV (2011): AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquat. Toxicol.* 101, 165-174
- Selck H, Granberg ME, Forbes VE (2005): Impact of sediment organic matter quality on the fate and effects of fluoranthene in the infaunal brittle star *Amphiura filiformis*. *Mar. Environ. Res.* 59, 19-45
- Shen H, Huang Y, Wang R, Zhu D, Li W, Shen G, Wang B, Zhang Y, Chen Y, Lu Y, Chen H, Li T, Sun K, Li B, Liu W, Liu J, Tao S (2013): Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6415-6424
- Shima A, Mitani H (2004): Medaka as a research organism: past, present and future. *Mech. Dev.* 121, 599-604
- Short JW, Kolak JJ, Payne JR, Van Kooten GK (2007): An evaluation of petrogenic hydrocarbons in northern Gulf of Alaska continental shelf sediments – The role of coastal oil seep inputs. *Org. Geochem.* 38, 643-670
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191
- Solemdal P (1997): Maternal effects - a link between the past and the future. *J. Sea Res.* 37, 213-227
- Sundberg H, Ishaq R, Akerman G, Tjarnlund U, Zebuhr Y, Linderöth M, Broman D, Balk L (2005): A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. *Toxicol. Sci.* 84, 63-72
- Sundberg H, Hanson M, Liewenborg B, Zebühr Y, Broman D, Balk L (2007): Dredging Associated Effects: Maternally Transferred Pollutants and DNA Adducts in Feral Fish. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2972-2977
- Sverdrup LE, Nielsen T, Henning Krogh P (2002): Soil Ecotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Relation to Soil Sorption, Lipophilicity, and Water Solubility. *Environmental Science and Technology* 36

- Tchoudakova A, Kishida M, Wood E, Callard GV (2001): Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 78, 427-439
- ter Laak TL, ter Bekke MA, Hermens JLM (2009): Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms. Environ. Sci. Technol. 43, 7212-7217
- Tilghman Hall A, Oris JT (1991): Anthracene reduces reproductive potential is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. Aquat. Toxicol. 19, 249-264
- Turcotte D, Akhtar P, Bowerman M, Kiparissis Y, Brown S, Hodson PV (2011): Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. Environ. Toxicol. Chem. 30, 487-495
- Turner A, Rawling MC (2001): The influence of salting out on the sorption of neutral organic compounds in estuaries. Water Res. 35, 4379-4389
- Tuvikene A (1995): Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Ann. Zool. Fenn. 32, 295-309
- USEPA 1990: Clean air act. Part A - Air Quality and Emission Limitation. Hazardous air pollutants
- van de Meent D, Hollander A, Comber M, Parkerton T (2010): Environmental fate factors and human intake fractions for risk assessment of petroleum products. Integr. Environ. Assess. Manage. 6, 135-144
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149
- van Noort PCM (2009): Estimation of amorphous organic carbon/water partition coefficients, subcooled aqueous solubilities, and n-octanol/water distribution coefficients of alkylbenzenes and polycyclic aromatic hydrocarbons. Chemosphere 74, 1018-1023
- Vane CH, Harrison I, Kim AW (2007): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the Mersey Estuary, U.K. Sci. Total Environ. 374, 112-126
- Vane CH, Harrison I, Kim AW, Moss-Hayes V, Vickers BP, Horton BP (2008): Status of organic pollutants in surface sediments of Barnegat Bay-Little Egg Harbor Estuary, New Jersey, USA. Mar. Pollut. Bull. 56, 1802-1808
- Velsen FPJ 1987: Temperature and Incubation in Pacific Salmon and Rainbow Trout: Compilation of Data on Median Hatching Time, Mortality and Embryonic Staging
- Vernier (1836): Table chronologique du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. Annals of Embryology and Morphology 2, 495-520
- Vicquelin L 2011: Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques vis-à-vis des embryons et des larves de médaka japonais, *Oryzias latipes*. Contribution à l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution chimique des sédiments de l'estuaire de Seine, Université du Havre, Le Havre

- Vicquelin L, Leray-Forget JL, Peluhet L, LeMenach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J (2011): A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235-245
- Vignet C, Lucas J, Le Menach K, Lyphout L, Perrichon P, Le Bihanic F, Haget C, Bégout M-L, Budzinski H, Cousin X (*soumis*): Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafis - Part I : Survival and growth. *Environ Sci Pollut Res*
- Vives I, Grimalt JO, Fernández P, Rosseland B (2004): Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland. *Sci. Total Environ.* 324, 67-77
- Wang Z, Hollebone BP, Fingas M, Fieldhouse B, Sigouin L, Landriault M, Smith P, Noonan J, Thouin G (2003): Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. US EPA
- Warren-Photographic (2013): Rainbow trout egg development
- Wassenberg DM, Giulio RTD (2004): Teratogenesis in *Fundulus heteroclitus* embryos exposed to a creosote-contaminated sediment extract and CYP1A inhibitors. *Mar. Environ. Res.* 58, 163-168
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000): Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347-570
- Wilson PJ, Tillitt DE (1996): Rainbow trout embryotoxicity of a complex contaminant mixture extracted from Lake Michigan lake trout. *Mar. Environ. Res.* 42, 129-134
- Wölz J, Engwall M, Maletz S, Olsman Takner H, van Bavel B, Kammann U, Klempt M, Weber R, Braunbeck T, Hollert H (2008): Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine — a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environ Sci Pollut Res* 15, 536-553
- Yan J, Wang L, Fu PP, Yu H (2004): Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557, 99-108
- Zhang N (2011): The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *Journal of Cardiovascular Disease Research* 2, 91-95
- Zhang Y, Tao S (2009): Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmos. Environ.* 43, 812-819

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des présentations orales, affichées, vulgarisées et publications

Présentations orales:

Congrès internationaux

Le Bihanic F., Perrichon P., Budzinski H., Le Menach K., Morin B., Cousin X., Cachot J. Comparative effects of three PAH fractions from light and heavy crude oils and from a PAH-contaminated sediment on *Oryzias latipes* Japanese medaka early life stages. 3rd SETAC YES meeting, Cracovie, 11-13 Février 2013, Pologne.

Le Bihanic F., Budzinski H., Morin B., Cousin X., Cachot J. Direct exposure to PAH-spiked gravels induce developmental defects in *Oncorhynchus mykiss* early life stages. PRIMO 17th, Faro, 5-8 Mai 2013, Portugal.

Présentations affichées:

Congrès internationaux

Le Bihanic F., Somnard V., Perrichon P., Cousin X., Cachot J. A new reference artificial sediment for hydrophobic compound testing with the Japanese medaka embryo-larval assay (MELA). Fish and frog embryos. Aulnay-sous-Bois, 11-12 octobre 2012, France.

Le Bihanic F., Perrichon P., Cousin X., Cachot J. The use of Japanese medaka embryo-larval assay (MELA) and reference artificial sediment for toxicity assessment of hydrophobic pollutants. 1st conference on the Replacement, Reduction and Refinement in animal experiments on ecotoxicology. EuroEcotox, Dübendorf, 28-29 juin 2012, Suisse.

Le Bihanic F., Pichon A., Morin B., Berrada S., Cachot J. Micronucleus and alkaline comet assays in Japanese Medaka larvae: integrative methods for sensitive detection of genotoxicants in aquatic ecosystems. 6th SETAC World Congress, Berlin, 20-24 mai 2012, Germany.

Le Bihanic F., Couillard C.M., Rigaud C., Légaré B., Cachot J. Quantification de l'activité 7-ethoxyresorufine-*O*-dééthylase (EROD) sur des larves individuelles vivantes de *Fundulus heteroclitus* ECOBIM GDR-I-EXECO, Nantes, 18-19 mai 2010, France.

Congrès nationaux

Cachot J., **Le Bihanic F.**, Barjhoux I., Vicquelin L., Landi L., Clérandeau C., Morin B., 2012. Utilisation des embryons et larves de médaka japonais pour l'évaluation de la qualité des masses d'eau et des sédiments. ECOBIM, Reims, 5-8 juin 2012.

Le Bihanic F., Cachot J., Cousin X., Le Menach K., Morin B., Budzinski H. Etude de la toxicité de sédiments enrobés avec du 7,12-diméthylbenz(a)anthracène sur embryons de médaka japonais *Oryzias latipes* ECOBIM, Arcachon, 6-9 juin 2011, France.

Présentations vulgarisées:

Le Bihanic F. Mise au point d'un sédiment artificiel de référence adapté au test embryolaire poisson : aspects phénotypiques et comportementaux. Séminaire laboratoire LPTC, Talence, 27 janvier 2012.

Le Bihanic F. Etude des effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les stades précoces de développement de poissons modèles. Journée de l'école doctorale EDSE, Talence, 24 mai 2013.

Publications:

Le Bihanic F, Couillard CM, Rigaud C, Légraré B (2013): A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. Mar. Environ. Res. 84, 17-23

Le Bihanic F, Perrichon P, Landi L, Clérandeau C, Menach K, Budzinski H, Cousin X, Cachot J (2014): Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. Environ Sci Pollut Res, 1-14

Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Budzinski H, Menach K, Cachot J (2014): Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. Environ Sci Pollut Res, 1-12

Le Bihanic F, Clérandeau C, Menach K, Morin B, Budzinski H, Cousin X, Cachot J (2014): Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. Environ Sci Pollut Res, 1-12

Vignet C, Le Menach K, Mazurais D, Lucas J, Perrichon P, **Le Bihanic F**, Devier M-H, Lyphout L, Frère L, Bégout M-L, Zambonino-Infante J-L, Budzinski H, Cousin X (2014): Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish - part I: Survival and growth. Environ Sci Pollut Res, 1-14 *in press*

Larcher T, Perrichon P, Vignet C, Ledevin M, Menach K, Lyphout L, Landi L, Clérandeau C, **Le Bihanic F**, Ménard D, Burgeot T, Budzinski H, Akcha F, Cachot J, Cousin X (2014): Chronic dietary exposure of zebrafish to PAH mixtures results in carcinogenic but not genotoxic effects. Environ Sci Pollut Res, 1-17

Perrichon P, **Le Bihanic F**, Bustamente P, Budzinski H, Cachot J, Cousin X (*en révision*): Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact assay. Environ Sci Pollut Res

Le Bihanic F, Somnard V, Pichon A, Grasset J, Berrada S, Budzinski H, Cousin X, Morin B, Cachot J, Combined bioassays in Japanese medaka embryos for integrative toxicity assessments of pollutants accumulated in sediments: application to benz[a]anthracene. *En préparation*.

Le Bihanic F, Le Menach K, Daffe G, Budzinski H, Gonzalez P, Cousin X, Cachot : Gene transcription levels versus PAH bioavailability and bioaccumulation in Japanese medaka early life stages exposed to PAH-spiked sediments. *En preparation*

ANNEXE 2 : A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva

L'article publié est réimprimé avec l'autorisation des éditeurs.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvres

A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva

Floranne Le Bihanic^a, Catherine M. Couillard^{b,*}, Cyril Rigaud^{b,c}, Benoît Légaré^b

^a Université de Bordeaux 1, EPOC-LPTC, UMR CNRS 5805, Talence 33405, France

^b Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, Mont-Joli, QC G5H 3Z4, Canada

^c Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2012

Received in revised form

5 November 2012

Accepted 7 November 2012

Keywords:

Ethoxyresorufin-O-deethylase

EROD

Fundulus heteroclitus

Embryo

Larva

PCB126

ABSTRACT

Dioxin-like compounds (DLC) induce toxic responses in early life stages of fish through activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) which is frequently assessed by ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. A novel spectrofluorimetric method was developed to quantitatively assess EROD activity in individual living embryos and prolarvae of a marine model fish species, the mummichog *Fundulus heteroclitus*. This *in vivo* method is based on the measurement of the production of resorufin by single live embryos or prolarvae after 5 h incubation with ethoxyresorufin. Freshly fertilized eggs were treated topically from 2.5 to 50 pg egg⁻¹, with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), a prototypical DLC. EROD activity was assessed in embryos (7 days post-fertilization) and prolarvae (16 days post-fertilization). Resorufin was measured both in the culture medium (25‰ seawater) and in whole fish homogenates, to assess the percentage retained in the body. Approximately 95% and 17% of the resorufin produced *in vivo* was retained in embryos and prolarvae respectively. EROD activity in homogenates of embryos and in the culture medium of prolarvae increased linearly with dose. EROD activity measured by the *in vivo* method was highly correlated to that measured by a traditional *in vitro* technique using S9 fractions for both embryos and prolarvae. Both *in vivo* and *in vitro* EROD activity were higher in prolarvae than in embryos pretreated with PCB126. EROD induction measured in prolarvae by the *in vivo* and *in vitro* methods were similar whereas higher induction was measured *in vivo* than *in vitro* in embryos. The *in vivo* method was more sensitive and as reliable as the *in vitro* technique, and required a lower number of fish (4 compared to 3 pools of 5). This *in vivo* method is useful to link EROD induction in individual embryos or prolarvae to other organism-level responses. Further studies with other categories of xenobiotics should be performed to assess potential toxic effects on resorufin absorption/excretion processes which could affect *in vivo* measurements.

Crown Copyright © 2012 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dioxin-like compounds (DLCs) such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), co-planar polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzo-*p*-furans (PCDFs) accumulate in the aquatic environment and can induce detrimental effects in fish populations (Van der Oost et al., 2003; Incardona et al., 2004). Their mode of action involves in part the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Whyte et al., 2000; Kodavanti, 2005). Binding of pollutants to AhR leads to over-expression of several genes, including cytochrome P4501A (CYP1A). Production of the protein P4501A resulting from this

cytochrome gene activation can be assessed by measuring induction of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. EROD activity is measured by detecting the increase in fluorescence of resorufin, the product of deethylation of the substrate 7-ethoxyresorufin (7-ER) (Whyte et al., 2000). EROD activity in the microsomal fraction of adult and juvenile fish liver is widely used as a biomarker of exposure and as an early-warning sign for potentially harmful effects of DLCs and other organic pollutants (Van der Oost et al., 2003).

Early life stages of fish are highly sensitive to AhR-mediated toxicity leading to lethal and sublethal adverse effects with potential impacts on recruitment (Cook et al., 2003; Carls et al., 2005). Measurement of EROD activity in early life stages is challenging because of the small size of embryo and prolarvae. First measurements were performed using a standard fluorometrical method on 10 000–13 500 g supernatant prepared from composite

* Corresponding author.

E-mail address: Catherine.Couillard@dfo-mpo.gc.ca (C.M. Couillard).

samples of 20–30 whole prolarvae of various fish species (Peters et al., 1994; Stagg and McIntosh, 1996). With the development of EROD assays on fluorescence microplate readers (Kennedy et al., 1993), EROD activity could be measured on the microsomes of 10 (Meyer and Di Giulio, 2002) or on the S9 fraction of 5 whole *Fundulus heteroclitus* prolarvae (Couillard et al., 2011). These assays are based on *in vitro* biotransformation activity in cells homogenates and thus are terminal, requiring euthanasia prior to analyses. Therefore, EROD induction in fish prolarvae cannot be linked to later developing responses in the same individuals such as poor growth or survival. These assays are fully quantitative. However, these analyses are done on pools of multiple individuals and thus consume a large number of prolarvae, provide poor estimates of interindividual variability and limit the possibility to correlate EROD activity with other individual responses.

To overcome the disadvantages of the *in vitro* assays using whole prolarvae homogenates, Nacci et al. (1998) developed an *in vivo* (*in ovo*) technique which permits a semi-quantitative assessment of EROD activity in single living *F. heteroclitus* embryos. This method uses fluorescence microscopy coupled with a photometer system to measure resorufin accumulation in the embryo's bladder after 7-day aqueous exposure to ethoxyresorufin. Using a fully quantitative spectrofluorimetric method, Noury et al. (2006) measured resorufin production in the culture medium of groups of 10 live zebrafish (*Danio rerio*) prolarvae exposed to waterborne ethoxyresorufin during 4–6 h. Both of these assays are based on *in vivo* biotransformation of ethoxyresorufin in living embryos and prolarvae and are non destructive. They measure the endpoint of numerous processes including uptake of ethoxyresorufin, phase I and II metabolism and excretion of resorufin (Table 1).

The objective of our study was to develop and validate a fully quantitative spectrofluorimetric method to measure EROD activity in individual living embryos and prolarvae of a marine model fish, the mummichog, *F. heteroclitus*. The well-known development, the transparency of the chorion and the simple maintenance make this species a widely used experimental model for embryotoxicity studies (Burnett et al., 2007). The proposed method is a modification of Noury et al. (2006) and is performed on single individuals rather than groups of 10 prolarvae in the original method. It is fully quantitative as opposed to the semi-quantitative method developed by Nacci et al. (1998) for single embryos. A prototypical PCB, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) was selected for these experiments, as a known inducer of EROD activity in early life stages of *F. heteroclitus* (Couillard et al., 2011).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126, solid form, 99% purity) was purchased from Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) supplied DMSO (dimethyl

sulfoxide, 99% purity), tricaine methane sulfonate (MS-222), 7-ethoxyresorufine (7-ER) and resorufin.

2.2. Spawners and eggs handling

Mummichog spawners were captured in Horton's Creek (Miramichi, NB, Canada), kept in 420 L tanks filled with flowing filtered natural seawater (25‰, St. Lawrence Estuary water filtered on 0.8–1.2 mm-thick silica sand) and fed with pelleted cichlid food (Nutrafin®, Rolf C. Hagen, Montreal, QC, Canada) supplemented with dry shrimps and *Tubifex* worms. In order to induce gonad maturation, water temperature was raised progressively from approximately 11 °C to 19 °C and photoperiod was set to 16 h light and 8 h dark. Freshly spawned eggs were collected on artificial plastic algae used as spawning substrate. Eggs were pooled into Petri dishes filled with natural seawater and examined with a stereo-microscope. Normal fertilized eggs were retained for the experiments using the following criteria: transparent chorion, vitelline droplets at one pole, regular shape and developmental stage between 9 and 11, according to Armstrong and Child (1965). Eggs were randomly selected for the experiments.

2.3. Embryos exposure

At 3–4 h post-fertilization, 0.1 µL of a PCB126 solution in DMSO was dropped on the surface of the chorion using a 1 µL Hamilton syringe (Helmstetter and Alden, 1995; Couillard et al., 2008, 2011). In Experiments A and B, embryos were exposed to graded doses of PCB126: unexposed (control), DMSO only (control), 2.5, 5, 10, 25 and 50 pg PCB126 egg⁻¹. To assess repeatability, eggs were treated with DMSO only or 25 pg PCB126 egg⁻¹ in two other experiments (D and E). One last experiment (C) was performed to assess the proportion of resorufin retained in the prolarvae during *in vivo* measurements. In Experiment C, eggs were treated with DMSO only, 5 and 50 pg PCB126 egg⁻¹.

Sample size were respectively, 25 eggs per treatment for experiment A and 20 eggs per treatment for experiments B, C, D and E. Eggs were incubated on moistened filter paper (15‰ natural UV-filtered salt water) at 22.5 °C, under a 14 h : 10 h photoperiod. In Experiment A, unhatched eggs were collected at 7 days post-fertilization (DPF) for *in vivo* (N = 4) and *in vitro* measurement of EROD activity (N = 3 pools of 5). To assess the proportion of resorufin retained into the eggs, *in vivo* measurements were conducted before and after homogenization of the eggs. In the other experiments, incubation was pursued until 13 DPF when hatching was triggered by immersion in 25‰ seawater. Newly hatched prolarvae were maintained individually at 22.5 °C in 20 mL glass scintillation vials containing 15 mL of filtered natural seawater (salinity 25‰) renewed daily until 16 DPF. In Experiment B, D and E, 16 DPF prolarvae were collected for *in vivo* (N = 4) and *in vitro* EROD (N = 3 pools of 5) determination. In Experiment C, 16 DPF prolarvae

Table 1
Methods developed to measure EROD activity in fish embryos and prolarvae.

	Method	Species	Stage	Destructive	Kinetics	N individual ^a	N sample ^b	Quantitative
Couillard et al. (2008)	Spectrofluorometric <i>in vitro</i> – S9	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Embryo	Yes	Yes	Pool of 5	3	Yes
		<i>Fundulus heteroclitus</i>	Prolarva	Yes	Yes	Pool of 5	3	Yes
Nacci et al. (1998)	Microscopic <i>in vivo</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Embryo	No	No	1	20–60	Semi
Matson et al. (2008)	Microscopic <i>in vivo</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Prolarva	No	No	1	15–118	Semi
Noury et al. (2006)	Spectrofluorometric <i>in vivo</i>	<i>Danio rerio</i>	Prolarva	No	Yes	Pool of 10	6	Yes
This study	Spectrofluorometric <i>in vivo</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Embryo	Yes	No	1	4	Yes
		<i>Fundulus heteroclitus</i>	Prolarva	No	No	1	4	Yes

^a Number of individuals required per sample.

^b Number of samples analyzed per treatment.

($N = 4$ individual prolarvae) were collected for *in vivo* EROD determination before and after homogenization of the prolarvae.

2.4. *In vivo* EROD activity measurement

EROD activity measurements were performed according to Noury et al. (2006) methods with modifications (Fig. 1). Measurements were conducted on individual mummichog eggs at 7 DPF (organogenesis phase), and prolarvae at 16 DPF (end of eleutheroembryo phase) (Armstrong and Child, 1965). Sample size was calculated to 4 individuals required to reach blank mean value + 2 SD (standard deviation) ($\alpha = 0.05$, power = 0.8). Living eggs or prolarvae were put into individual wells of a 96-wells Costar® polystyrene microplate (Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA, USA). Four eggs or prolarvae per treatment (7 treatments) were randomly distributed into 28 wells containing 190 μL of filtered natural seawater (25‰, 22.5 °C). After 1 h of acclimation in the dark, 10 μL of a 7-ER solution was added to each well in order to reach a final concentration of 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Preliminary measurements confirmed stability of 7-ER and resorufin in seawater and were used to select the optimal 7-ER concentration (unpublished data). Embryos or prolarvae ability to secrete resorufin was recorded during 5 h, using a Fluroskan Ascent® microplate fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ONT, Canada, $\lambda = 530$ nm for excitation, 590 nm for detection). Preliminary experiments indicated that there were marked variations in the shape of the kinetic curves among individuals treated with the same dose and among individuals treated with different doses (Fig. 2). The increase in resorufin concentration in the culture medium (seawater + 7-ER) was not always linear with some individuals having several peaks of excretion, especially at the beginning of the measurement period (Fig. 2). Therefore, EROD activity was assessed from a single fluorescence reading at 5 h. At the end of the measurement, 10 μL of

40 mg L^{-1} tricaine methane sulfonate (MS-222) was added into each well for euthanasia.

In experiments A and C, directly at the end of the *in vivo* measurement and after anesthesia with MS-222, each individual egg or prolarva was rinsed with milli-Q water, dried and individually transferred into 100 μL or 200 μL respectively of milli-Q water in 1.5 mL Eppendorf® tubes. These individuals were homogenized and the fluorescence of each homogenate was immediately measured using a Fluroskan Ascent® microplate fluorometer (Thermo Labsystems, $\lambda = 530$ nm for excitation, 590 nm for detection). These measurements were performed to assess the proportion of resorufin retained in the egg or the prolarva and not excreted in the culture medium. A fluorescence standard curve was performed using resorufin dilution in DMSO and seawater over a range of fluorescence typically measured for embryos or prolarvae. Fluorescence measurements were linearly dependent of resorufin standard concentrations. Resorufin measured in wells after 5 h incubation was indicative of resorufin production during this time period and was expressed as fluorescence unit per embryo or prolarva.

2.5. *In vitro* EROD activity measurement

To validate the *in vivo* method in comparison with the standard *in vitro* method for EROD activity measurement (Meyer and Di Giulio, 2002; Couillard et al., 2011), *in vitro* measurements were also conducted on the S9 fraction of embryos and prolarvae generated from Experiments A, B and D (Fig. 1). Four pools of 5 eggs (7 DPF, Experiment A) or 3 pools of 5 prolarvae (16 DPF, Experiments B and D) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses. Composite samples were homogenized in HEPES buffer and centrifuged at 4 °C, 10 000 \times g, during 20 min. Each well of a 96-well microplate received 50 μL of this S9 fraction, 7-ER (final

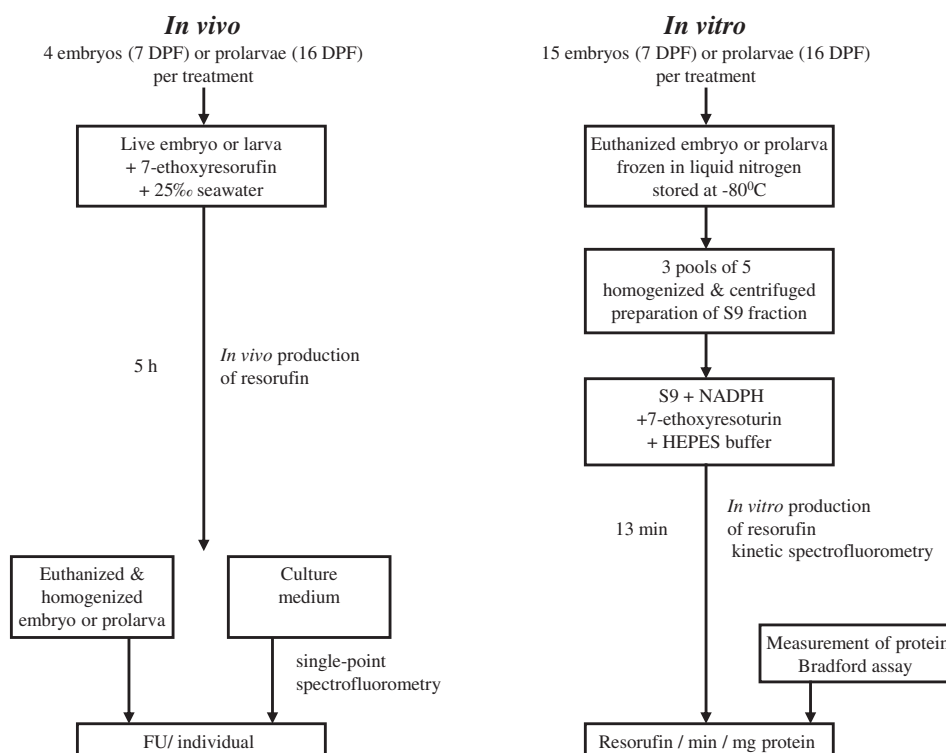


Fig. 1. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* EROD activity measurement methods in *Fundulus heteroclitus* embryos (7 DPF) and prolarvae (16 DPF). DPF and FU refer respectively to days post-fertilization and fluorescence units.

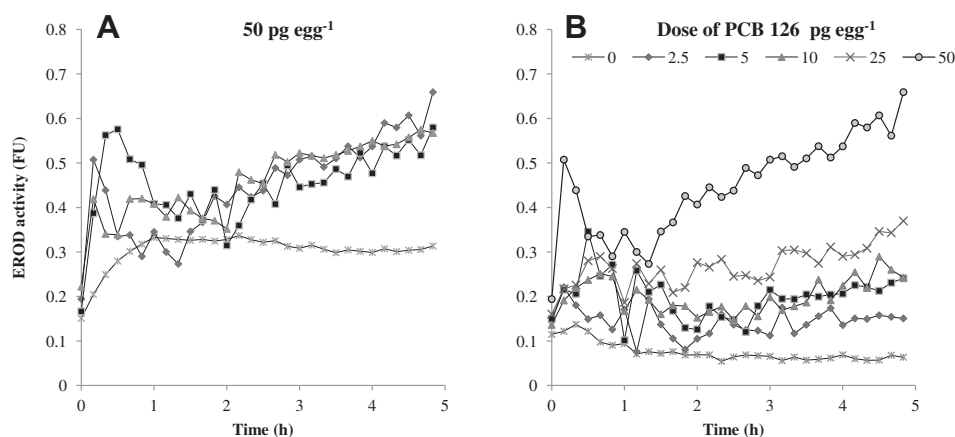


Fig. 2. Representative examples of kinetic curves of resorufin production for *Fundulus heteroclitus* larvae at 16 DPF measured *in vivo* in the culture medium (Experiment B). A) Inter-individual variation of kinetic curves for prolarvae originating from eggs pretreated topically with 50 pg PCB126 egg⁻¹; B) Variation of kinetic curves among prolarvae treated with different doses. Each point represents a measurement for one individual larva. One measurement was performed every 10 min during 5 h ($N = 1$).

well concentration of 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and NADPH (final well concentration of 1.8 mg mL^{-1}). Fluorescence was measured during 13 min, at 60 s intervals ($\lambda = 530 \text{ nm}$ for excitation, 590 nm for detection), using a Cytofluor II[®] plate reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Readings were compared to a resorufin standard curve including blanks. Total protein content of the S9 fraction was measured with a Bradford protein assay (Bradford, 1976). EROD activity was expressed as $\text{pmol resorufin min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

2.6. Statistical analyses

EROD activity was expressed as percent relative to DMSO controls for purpose of comparison among different experiments and different methods of measurements of EROD activity. Because some data sets were not normally distributed (Shapiro–Wilk normality test, $\alpha = 0.05$) comparisons among treatments were performed with a non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA by ranks (KW, $\alpha = 0.05$). When significant differences were detected ($p < 0.05$), it was followed by a multiple comparison Tukey's test on the ranked values, as suggested by Conover and Iman (1981). Rank transformation usually corrects for heteroscedasticity because the variance of rank data is automatically stable (Potvin and Roff, 1993).

Linear regressions were used to assess dose–response relationships and correlation analyses were used to assess the strength of the relation between *in vivo* and *in vitro* results.

3. Results

3.1. EROD activity measured in embryos

For the *in vivo* method on embryos, no significant induction of EROD activity by PCB126 was measured in the culture medium whereas significant induction was detected in the homogenates of embryos treated with $\geq 2.5 \text{ pg PCB126 egg}^{-1}$ (Fig. 3A). Approximately 95% of the total resorufin measured (culture medium + homogenates) was retained in the embryo at 50 pg g^{-1} . EROD activity in the homogenates increased linearly with doses ($R^2 = 0.92$, $p < 0.0001$, $N = 4$ embryos per dose) from 0 to 25 pg egg^{-1} with a reduction at the highest dose (Fig. 3A). The lowest observed effective dose LOED was 2.5 pg egg^{-1} . Maximal induction in embryo homogenates at 25 pg egg^{-1} was 660%, equivalent to 7.5 fold higher than control.

In contrast, for the *in vitro* method, EROD activity increased linearly in the S9 fraction from 0 to 50 $\text{pg PCB126 egg}^{-1}$ ($R^2 = 0.84$, $p < 0.0001$, $N = 3$ pools of 5 embryos per dose) and the LOED was

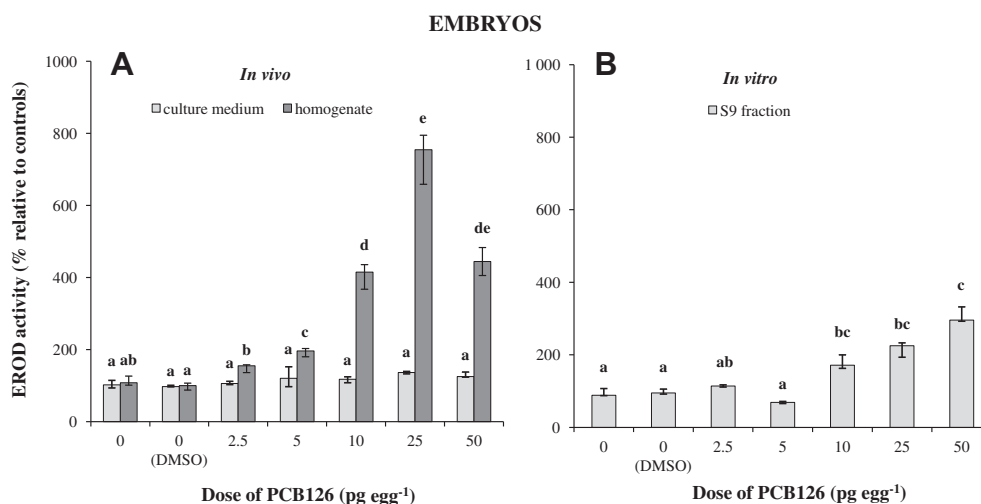


Fig. 3. EROD activity of *Fundulus heteroclitus* embryos at 7 DPF measured A) *in vivo* both in the culture medium and in their respective homogenates and B) *in vitro* in the S9 fraction. Eggs were treated topically with graded doses of PCB126 few hours after fertilization (Experiment A). Values are expressed as medians (bars), first and third quartiles (vertical lines). Different letters refer to significant differences among treatments for each measurement (KW, $p < 0.05$). A) $N = 4$ individuals, B) $N = 3$ pools of 5.

10 pg egg⁻¹ (Fig. 3B). Maximal induction at 50 pg egg⁻¹ was 296%, equivalent to 3.1 fold higher than control, thus lower than the induction measured by the *in vivo* method.

EROD responses for the *in vivo* method on homogenates and the *in vitro* method on S9 fraction were significantly correlated ($r = 0.93$, $p = 0.02$).

3.2. EROD activity measured in prolarvae

For the *in vivo* method on prolarvae, EROD activity in the culture medium increased linearly with dose ($R^2 = 0.81$, $p < 0.0001$, $N = 4$ larvae per dose) in prolarvae treated from 0 to 50 pg PCB126 egg⁻¹ (Fig. 4A). The lowest observed effective dose (LOED) was 2.5 pg egg⁻¹. Maximal induction in the culture medium at 50 pg egg⁻¹ was 13 fold higher than control (Figs. 4A and 5A). A 3.4 fold increase of EROD activity was detected in prolarvae homogenates at 50 pg egg⁻¹ with no significant induction at 5 pg egg⁻¹ (Fig. 5A). The resorufin retained in the prolarvae at 50 pg egg⁻¹ was approximately 17% of the total resorufin measured in both the culture medium and the prolarvae homogenates. Excreted resorufin was moderately correlated with resorufin retained in the homogenates ($r = 0.74$, $p = 0.006$) (Fig. 5B).

For the *in vitro* method in the S9 fraction of PCB126 treated prolarvae, EROD activity increased linearly from 0 to 50 pg egg⁻¹ ($R^2 = 0.91$, $p < 0.0001$, $N = 3$ pools of 5 larvae per dose) and LOED was 5 pg egg⁻¹ (Fig. 4B). Maximal induction at 50 pg egg⁻¹ was similar to that observed for the *in vivo* method, 12.6 fold higher than control. EROD activity assessed by the *in vivo* method in the culture medium and by the *in vitro* method in the S9 fraction were highly correlated ($r = 0.96$, $p = 0.02$).

For a dose of 25 pg egg⁻¹, EROD activity measured either *in vivo* in the culture medium or *in vitro* did not differed significantly among three different experiments (Table 2). Thus, the *in vivo* and the *in vitro* method for measurement of EROD activity in prolarvae appeared equally reliable.

4. Discussion

We have developed a quantitative spectrofluorimetric method to measure EROD activity *in vivo* in single *F. heteroclitus* embryos or prolarvae. This *in vivo* method is more sensitive (Figs. 3 and 4), and as reliable (Table 2) as the classical *in vitro* method (Fragoso et al., 1998; Couillard et al., 2008). Statistical power is increased as a consequence of a larger sample size for the *in vivo* method ($N = 4$ individuals) than for the *in vitro* method ($N = 3$ pools of 5), despite

a slightly higher inter-individual variability. Use of individuals compared to pooled samples for the *in vitro* technique reduces the total number of animals required for the measurements which is an asset for both animal welfare protection and for reduction of the time required for embryo manipulations. Furthermore, individual measurements are optimal for correlations with other molecular, cellular or organism-level responses. For prolarvae but not for chorionated embryos, the individual is alive at the end of the *in vivo* measurement and can be preserved for further analyses. The *in vivo* method reduces reactive costs since there is no need to add NADPH or to measure protein content. Moreover, the *in vivo* assay reduces the risk of loss of enzyme activity during sample processing and is more representative of the total metabolizing capacity of a live fish than a test conducted on S9 fraction alone.

However, the observed variable kinetic patterns during the *in vivo* assay are a concern and may reflect variable ethoxyresorufin absorption, metabolism and resorufin excretion among individuals (Figs. 2 and 5). Further studies with other categories of xenobiotics should be performed to assess potential toxic effects on resorufin absorption/excretion processes which could affect *in vivo* measurements. Noury et al. (2006) have reported a linear increase in resorufin concentration with time in 10 pooled zebrafish living prolarvae (from 1 to 5 days post-hatching) during 4–6 h of measurement. Difference in methods (single vs pooled prolarvae) and between species could explain this discrepancy (Table 1). Further studies are needed to adapt the *in vivo* EROD assay for various fish species.

The *in vivo* is more efficient than the *in vitro* method for the measurement of EROD activity in chorionated embryos, more difficult to homogenized than hatched larvae. Detected EROD activity induction in chorionated embryos was 3.3 times higher when measured *in vivo* than *in vitro*, likely as a consequence of losses during sample preparation for *in vitro* assays. This was not observed for prolarvae easier to homogenize than chorionated embryos. In the *in vivo* assay, embryos retained about 95% resorufin produced in their tissues while prolarvae excreted more than 80%. Consequently embryos need to be homogenized for spectrofluorimetric measurement. Alternatively the fluorimetric microscopic technique, developed by Nacci et al. (1998), measuring resorufin in the urinary bladder can be performed without killing the embryos but is semi-quantitative and more labor-intensive (Table 1). This method has been applied to prolarvae by measuring the resorufin retained in the gall bladder or gastrointestinal tract (Billiard et al., 2006; Matson et al., 2008). However, the majority of the resorufin produced by the prolarvae is excreted in the culture medium (Fig. 5). Therefore, the microscopic method may not provide an accurate estimation of

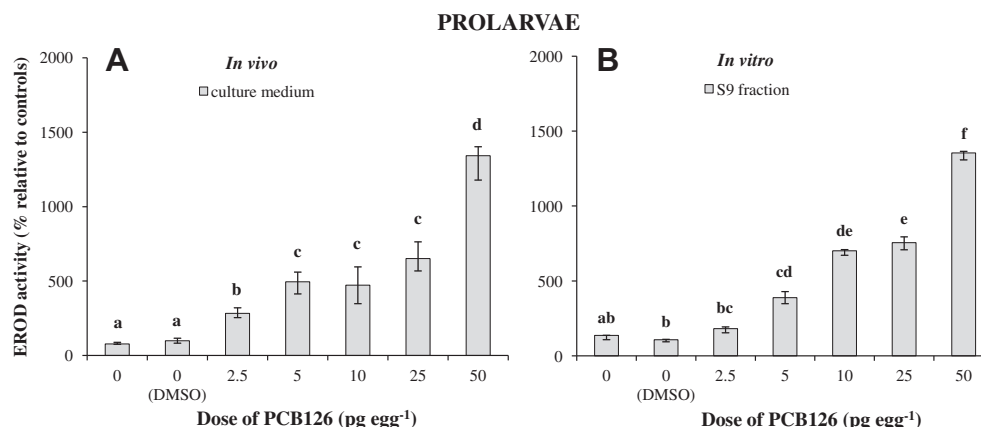


Fig. 4. EROD activity of *Fundulus heteroclitus* prolarvae at 16 DPF measured A) *in vivo* in the culture medium and B) *in vitro* in the S9 fraction. Prolarvae originated from eggs pretreated with graded doses of PCB126 few hours after fertilization (Experiment B). Values are expressed as medians (bars), first and third quartiles (vertical lines). Different letters refer to significant differences among treatments for each measurement (KW, $p < 0.05$). A) $N = 4$ individuals, B) $N = 3$ pools of 5.

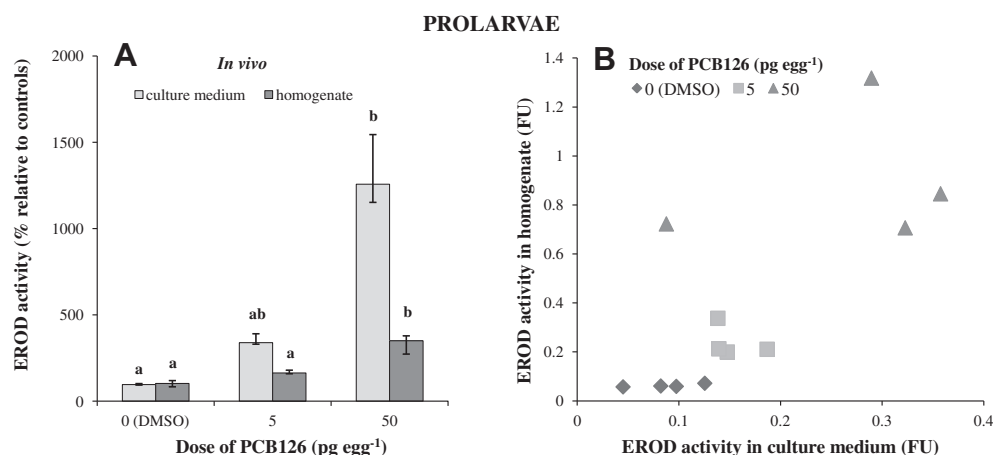


Fig. 5. A) EROD activity of *Fundulus heteroclitus* prolarvae at 16 DPF measured *in vivo* in the culture medium and in their respective homogenates. Prolarvae originated from eggs pretreated topically with DMSO, 5 or 50 pg egg⁻¹ PCB126 few hours after fertilization (Experiment C). Values are expressed as medians (bars), first and third quartiles (vertical lines). Different letters refer to significant differences among treatments for each measurement (KW, $p < 0.05$, $N = 4$ individuals). B) Relationship between EROD activity measured in the culture medium and in prolarvae homogenates. FU are fluorescence unit.

Table 2
Repeated measurements of EROD activity *in vivo* in culture medium, and *in vitro*, in the S9 fraction, in *Fundulus heteroclitus* prolarvae at 16 DPF: Experiment B, D & E. EROD activity is expressed as % relative to DMSO controls.

Experiment	<i>In vivo</i> ^{b,c}		<i>In vitro</i> ^{c,d}	
	0 (DMSO)	25 pg PCB126 egg ^{-1a}	0 (DMSO)	25 pg PCB126 egg ^{-1a}
B	96.9 (77.6/119.0)A	766.4 (664/864.0)B	107.7 (93.6/110.0)A	755.1 (707.7/794.0)B
D	98.3 (82.5/116.0)A	651.5 (567.7/763.0)B	96.7 (96.0/102.0)A	999.1 (815.6/1131.0)B
E	108.7 (98.8/110.0)A	554.0 (511.5/596.0)B	—	—

^a Eggs were treated topically with PCB126 (25 pg egg⁻¹) few hours after fertilization.

^b Values are expressed as medians (first quartile/third quartile). Different capital letters refer to significant differences among treatments for each measurement (KW, $p < 0.05$).

^c culture medium, $N = 4$ individuals.

^d S9 fraction, $N = 3$ pools of 5.

EROD activity in prolarvae. Further studies are needed to validate the use of the microscopic technique in prolarvae. In addition, the possible interaction between ethoxyresorufin and the toxic compounds of interest should also be investigated in embryos exposed from 2 to 10 days post-hatching to this substrate (Nacci et al., 1998) or during 5 h as in our study.

EROD induction measured *in vitro* in S9 fraction was 4.6 times higher for prolarvae than for embryos pre-treated with 10–50 pg egg⁻¹ PCB126. Higher cytochrome P450 activity (*in vitro* on microsomes) post-hatching compared to pre-hatching was reported previously in *F. heteroclitus* exposed to PCBs (Binder et al., 1985). In contrast, a less pronounced difference of EROD induction between embryos and prolarvae (3 times higher in prolarvae) at 10–50 pg egg⁻¹ is observed with the *in vivo* technique. This is possibly due to an underestimation of EROD activity in chorionated embryos with the *in vitro* technique as a consequence of a loss of activity during sample processing.

In vivo embryo EROD induction tends to be lower at 50 pg egg⁻¹ than at 25 pg egg⁻¹. Using an *in vivo* microscopic technique has also reported reduction of EROD activity in *F. heteroclitus* embryos exposed to high doses of PCB126 (Nacci et al., 1998). In contrast, no reduction of EROD activity is observed at 50 pg egg⁻¹ compared to 25 pg egg⁻¹ when EROD activity is measured *in vitro* on S9 fractions prepared from embryos. The reduction of *in vivo* EROD activity at the highest PCB126 dose is observed in chorionated embryos but not in prolarvae. Post-transcriptional suppression of CYP1A activity associated with oxidant damage was demonstrated in liver microsomes from scup (*Stenotomus chrysops*) exposed *in vitro* to PCB126 (Schlezinger et al., 2006). However, contrarily to what is observed in this study, CYP1A oxidative degradation would affect

both *in vivo* and *in vitro* EROD activity. Alternatively, high doses of PCB126 can alter cardiovascular development (Arzuaga and Elskus, 2010) and possibly the absorption and/or distribution of 7-ER in the living exposed embryos whereas these deformities would not impact 7-ER distribution in the S9 fraction.

In summary, we have developed a novel *in vivo* spectrofluorometric assay to quantitatively assess EROD activity in single live *F. heteroclitus* embryos or prolarvae exposed to a prototypical coplanar PCB. The method is more sensitive and as reliable as the traditional *in vitro* assay on S9 fraction. For chorionated embryos, it is more efficient than the *in vitro* technique and it is more quantitative and technically easier than the *in vivo* microscopic method (Nacci et al., 1998). However, contrarily to the microscopic method it is destructive for chorionated embryos since resorufin is measured in embryo homogenates. The *in vivo* microscopic method is not accurate for pro-larvae. Our *in vivo* spectrofluorometric method is applicable and non-destructive for pro-larvae since resorufin is measured in the culture medium. Contrarily to the *in vitro* method, it is done on individuals rather than pooled samples and thus is useful to explore the association between EROD induction in pro-larvae and other molecular, cellular or organism-level responses. Further studies are needed to assess the application of the method to other toxic compounds or other fish species.

Acknowledgments

We thank France Boily and Brigitte Desrosiers for their technical support. This project was funded by a Canadian National Research Council Strategic Grant (STPGP 350862–07), Fisheries and Ocean

Canada, the Centre Interinstitutionnel de Recherche en Écotoxicologie du Québec (CIRÉ) and the GDR EXECO.

References

- Armstrong, P.B., Child, J.S., 1965. Stages in the normal development of *Fundulus heteroclitus*. Biological Bulletin 128, 143–168.
- Arzuaga, X., Elskus, A., 2010. Polluted-site killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos are resistant to organic pollutant-mediated induction of CYP1A activity, reactive oxygen species, and heart deformities. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 676–682.
- Billiard, S.M., Timme-Laragy, A.R., Wassenberg, D.M., Cockman, C., Di Giulio, R.T., 2006. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. Toxicological Sciences 92, 526–536.
- Binder, R.L., Stegeman, J.J., Lech, J.J., 1985. Induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems in embryos and eleutheroembryos of the killifish *Fundulus heteroclitus*. Chemo-Biological Interactions 55, 185–202.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.
- Burnett, K.G., Bain, L.J., Baldwin, W.S., Callard, G.V., Cohen, S., Di Giulio, R.T., Evans, D.H., Gómez-Chiarri, M., Hahn, M.E., Hoover, C.A., Karchner, S.I., Katoh, F., MacLatchy, D.L., Marshall, W.S., Meyer, J.N., Nacci, D.E., Oleksiak, M.F., Rees, B.B., Singer, T.D., Stegeman, J.J., Towle, D.W., Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Whitehead, A., Winn, R.N., Crawford, D.L., 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: opportunities for new insights using genomics. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 2, 257–286.
- Carls, M.G., Heintz, R.A., Marty, G.D., Rice, S.D., 2005. Cytochrome P4501A induction in oil-exposed pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* embryos predicts reduced survival potential. Marine Ecology Progress Series 301, 253–265.
- Conover, W.J., Iman, L.R., 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. The American Statistician 35, 125–129.
- Cook, P.M., Robbins, J.A., Endicott, D.D., Lodge, K.B., Guiney, P.D., Walker, M.K., Zabel, E.W., Peterson, R.E., 2003. Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century. Environmental Science & Technology 37, 3864–3877.
- Couillard, C.M., Lebeuf, M., Légaré, B., Trottier, S., 2008. Effects of diazinon on Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae produced from eggs differentially treated with PCB126. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54, 283–291.
- Couillard, C.M., Légaré, B., Bernier, A., Dionne, Z., 2011. Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. Marine Environmental Research 71, 257–265.
- Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., Hodson, P.V., 1998. Chronic retene exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry 17, 2347–2353.
- Helmstetter, M.F., Alden, R.W., 1995. Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. Aquatic Toxicology 32, 1–13.
- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicology and Applied Pharmacology 196, 191–205.
- Kennedy, S.W., Lorenzen, A., James, C.A., Collins, B.T., 1993. Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. Analytical Biochemistry 211, 102–112.
- Kodavanti, P.R.S., 2005. Neurotoxicity of persistent organic pollutants: possible mode(s) of action and further considerations. Dose-Response 3, 273–305.
- Matson, C.W., Clark, B.W., Jenny, M.J., Fleming, C.R., Hahn, M.E., Di Giulio, R.T., 2008. Development of the morpholino gene knockdown technique in *Fundulus heteroclitus*: a tool for studying molecular mechanisms in an established environmental model. Aquatic Toxicology 87, 289–295.
- Meyer, J., Di Giulio, R., 2002. Patterns of heritability of decreased EROD activity and resistance to PCB 126-induced teratogenesis in laboratory-reared offspring of killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated site in the Elizabeth River, VA, USA. Marine Environmental Research 54, 621–626.
- Nacci, D., Coiro, L., Kuhn, A., Champlin, D., Munns, W., Specker, J., Cooper, K., 1998. Nondestructive indicator of ethoxyresorufin-O-deethylase activity in embryonic fish. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 2481–2486.
- Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R., Garric, J., 2006. Non destructive *in vivo* measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. Environmental Toxicology 21, 324–331.
- Peters, L.D., Porte, C., Albaigés, J., Livingstone, D.R., 1994. 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. Marine Pollution Bulletin 28, 299–304.
- Potvin, C., Roff, D.A., 1993. Distribution-free and robust statistical methods: viable alternatives to parametric statistics. Ecological Society of America 74, 1617–1628.
- Schleizinger, J.J., Struntz, W.D., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2006. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. Aquatic Toxicology 77, 422–432.
- Stagg, R.M., McIntosh, A., 1996. Hydrocarbon concentrations in the northern North Sea and effects on fish larvae. Science of The Total Environment 186, 189–201.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57–149.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Critical Reviews in Toxicology 30, 347–570.